

**Einfluss verschiedener Zellgifte, Mitogene und Schwermetalle
auf die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasefunktion
in Leberzell-Transplantat-enthaltenden Milzen
im Vergleich zur Leber bei der Ratte**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Udo Fuchs
geboren am 18.05.1973 in Jena / Thüringen

Diese Arbeit ist meiner Familie, insbesondere meiner lieben Mutter, meinen Großeltern und meiner Schwester gewidmet.

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit sind Inhalt folgender Kongressbeiträge und Veröffentlichungen:

Lupp A, Tralls M, Fuchs U, Lucas N, Klinger W. 1998. Transplantation of fetal liver tissue suspensions into the spleens of adult syngenic rats: effects of various inducers, mitogens and cell poisons on cytochrome P450 (P450) isoforms expression and on P450 mediated monooxygenase function. Exp Toxic Pathol 50: 120 (Abstracts des „16th European Workshop on Drug Metabolism“, Kopenhagen, Dänemark).

Lupp A, Tralls M, Fuchs U, Klinger W. 1999. Effects of various heavy metal salts on cytochrome P450-dependent monooxygenase functions in livers, intrasplenic liver cell transplants and kidneys of rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 359 (3), Suppl, R167 (Abstracts der 40. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Deutschland).

Lupp A, Tralls M, Fuchs U, Lucas N, Danz M, Klinger W. 1999. Transplantation of fetal liver tissue suspensions into the spleens of adult syngenic rats: effects of various mitogens and cytotoxins on cytochrome P450 (P450) isoforms expression and on P450 mediated monooxygenase functions. Exp Toxic Pathol 51: 375-388.

Lupp A, Tralls M, Fuchs U, Klinger W. 2001. Transplantation of fetal liver tissue suspensions into the spleens of adult syngenic rats (II): effects of different cytotoxins on cytochrome P450 mediated monooxygenase functions and on oxidative state. Exp Toxic Pathol 52: 529-538.

Lupp A, Lucas N, Tralls M, Fuchs U, Danz M. 2003. Effects of different mitogens on intrasplenic liver tissue transplants in comparison to orthotopic liver. Exp Toxic Pathol 54: 449-466.

INHALTSVERZEICHNIS

1. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	7
2. ZUSAMMENFASSUNG	8
3. EINLEITUNG	10
3.1. Organogenese der Leber	10
3.2. Bau der Leber	10
3.2.1. Unterschiede zwischen Ratten- und Menschenleber	14
3.3. Physiologie der Leber	14
3.3.1. Biotransformation	15
3.3.2. Das Cytochrom P450-System	16
3.3.3. Beeinflussung des Cytochrom P450-Systems durch körpereigene Substanzen und durch Fremdstoffe	20
3.4. In der vorliegenden Arbeit eingesetzte Testsubstanzen	23
3.4.1. Fluoren (FEN) und Fluorenol (FON)	23
3.4.2. Tetrachlorkohlenstoff (CCl ₄)	24
3.4.3. Brombenzol (BBZ)	25
3.4.4. Cadmium-Sulfat (CdSO ₄)	26
3.5. Funktionsstörungen der Leber und therapeutische Ansätze	27
4. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	35
5. MATERIAL UND METHODEN	37
5.1. Versuchstiere	37
5.2. Materialgewinnung	38
5.2.1. Herstellung des 9000g-Überstandes	38
5.2.2. Bestimmung des Proteingehaltes	38
5.3. Monooxygenase-Modellreaktionen	39
5.3.1. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)	39
5.3.2. Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)	40
5.3.3. Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND)	42
5.4. Herkunft der verwendeten Substanzen und Lösungen	44
5.5. Auswertung, statistische Methoden und Darstellung der Ergebnisse	44

6. ERGEBNISSE	45
6.1. Behandlung mit Fluoren	45
6.2. Behandlung mit Fluorenon	50
6.3. Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff	55
6.4. Behandlung mit Brombenzol	60
6.5. Behandlung mit Cadmium-Sulfat	65
7. DISKUSSION	70
7.1. Behandlung mit Fluoren	70
7.1.1. Einfluss von Fluoren auf die Organgewichte	70
7.1.2. Einfluss von Fluoren auf den Proteingehalt	70
7.1.3. Einfluss von Fluoren auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	71
7.1.4. Einfluss von Fluoren auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	71
7.1.5. Einfluss von Fluoren auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung	72
7.2. Behandlung mit Fluorenon	73
7.2.1. Einfluss von Fluorenon auf die Organgewichte	73
7.2.2. Einfluss von Fluorenon auf den Proteingehalt	73
7.2.3. Einfluss von Fluorenon auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	74
7.2.4. Einfluss von Fluorenon auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	74
7.2.5. Einfluss von Fluorenon auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung	75
7.3. Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff	75
7.3.1. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf die Organgewichte	75
7.3.2. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf den Proteingehalt	75
7.3.3. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	76
7.3.4. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	77
7.3.5. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ethylmorphin-N-Deethylierung	77
7.4. Behandlung mit Brombenzol	78
7.4.1. Einfluss von Brombenzol auf die Organgewichte	78
7.4.2. Einfluss von Brombenzol auf den Proteingehalt	78
7.4.3. Einfluss von Brombenzol auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	78
7.4.4. Einfluss von Brombenzol auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	79
7.4.5. Einfluss von Brombenzol auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung	79
7.5. Behandlung mit Cadmium-Sulfat	80
7.5.1. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf die Organgewichte	80
7.5.2. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf den Proteingehalt	80

7.5.3. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	81
7.5.4. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	81
7.5.5. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung	81
7.6. Allgemeine Schlussfolgerungen und Ausblick	82
8. LITERATURVERZEICHNIS	84
9. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	106
10. DANKSAGUNG	107
11. LEBENSLAUF	108

1. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

BBZ:	Brombenzol
CAR:	constitutive androstane receptor
CCl ₄ :	Tetrachlorkohlenstoff
CYP:	Cytochrom P450
DMSO:	Dimethylsulfoxid
ECOD:	Ethoxycoumarin-O-Deethylierung
EMND:	Ethylmorphin-N-Demethylierung
EROD:	Ethoxyresorufin-O-Deethylierung
FA:	Formaldehyd
FEN:	Fluoren
FON:	Fluorenon
G-6-P:	Glucose-6-Phosphat
GH:	growth hormone, Wachstumshormon
KG:	Körpergewicht
Na-P-Puffer:	Natriumphosphatpuffer
PPAR:	peroxisome proliferator activated receptor
PXR:	pregnane X receptor
Reso:	Resorufin
RXR:	retinoid X receptor
TCA:	Trichloressigsäure
TCDD:	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin
7-EC:	7-Ethoxycoumarin
7-OH-C:	7-Hydroxycoumarin

2. ZUSAMMENFASSUNG

Die orthotope Lebertransplantation ist Mittel der Wahl bei akutem oder chronischem Leberversagen oder zur Therapie einer genetisch bedingten Stoffwechselstörung. Limitierend ist hierbei jedoch vor allem ein Mangel an Spenderorganen. In einigen Fällen, z.B. zur passageren Entlastung der Leber bei akutem Leberversagen oder zur Therapie eines Enzymdefektes, könnte jedoch die Transplantation von Leberzellen in Fremdorgane wie die Milz eine mögliche Alternative darstellen. Hierzu ist bereits eine große Anzahl an experimentellen Transplantationen bei verschiedenen Tiermodellen durchgeführt worden. Auch gibt es erste Berichte über erfolgreiche Leberzelltransplantationen bei Patienten mit schwerer Leberzirrhose, mit genetischen Stoffwechselstörungen oder bei einem akuten Leberversagen zur Überbrückung der Zeit bis zur Regeneration der Leber bzw. bis zur orthotopen Lebertransplantation. Eine funktionelle Charakterisierung der transplantierten Zellen, vor allem hinsichtlich des Fremdstoffwechsels und der Beeinflussbarkeit durch endogene und exogene Faktoren, wie z.B. Fremdstoffe, ist bislang jedoch nur in sehr geringem Umfang erfolgt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, im Rahmen eines größeren Forschungsvorhabens einen Beitrag zur Charakterisierung in die Milz transplanteder syngener fetaler Leberzellen im Vergleich zur Leber zu leisten. Im Zusammenhang mit der Transplantation von Lebergewebe in Fremdorgane stellt sich nämlich die Frage, ob und inwieweit sich die veränderten Standortbedingungen auf das Transplantat auswirken und somit zu funktionellen Unterschieden zwischen heterotopem und orthotopem Lebergewebe führen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Substanzen mit charakteristischen Effekten auf die Leber ähnliche Wirkungen auch auf die Transplantate ausüben. Analysiert wurde vergleichend der Einfluss der Mitogene Fluoren und Fluorenol, der Zellgifte Tetrachlorkohlenstoff und Brombenzol sowie des Schwermetallsalzes Cadmium-Sulfat auf das Cytochrom P450 (CYP)-System der Lebern und der Transplantate, wobei vor allem die Wirkungen auf die CYP-abhängige Monooxygenasefunktion interessierten.

Als Tiermaterial für die Untersuchungen dienten Fischer-344-Inzucht-Ratten. Spender der Lebergewebesuspensionen waren Feten beiderlei Geschlechts vom 21. Schwangerschaftstag. Empfänger waren adulte, 60-90 Tage alte männliche Ratten. 4 Monate nach Transplantation, nach erfolgter Ausreifung der Transplantate, wurden die Transplantat-Empfänger sowie gleichaltrige nicht-transplantierte Kontrolltiere 24 bzw. 48 Stunden nach der Verabreichung von Fluoren, Fluorenol, Tetrachlorkohlenstoff, Brombenzol oder Cadmium-Sulfat zur Organentnahme getötet. In den 9000g-Überständen der Lebern und Milzen wurde dann

biochemisch die Substanzwirkung auf die CYP-Familien 1, 2 und 3 untersucht, da diese für den Fremdstoffwechsel besonders bedeutend sind. Hierzu wurden folgende Modellreaktionen für unterschiedliche CYP-Subtypen durchgeführt: Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD; hauptsächlich für CYP 1A-Isoformen), Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD; vorwiegend für die CYP-Familien 1A, 2A, 2B, 2C und 2E) und Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND; überwiegend für CYP 3A-Isoformen).

Während in den Milzen der Kontrolltiere unabhängig von der Behandlung nahezu keine Monooxygenase-Aktivitäten nachweisbar waren, fanden sich in den Transplantat-enthaltenden Organen bereits ohne Fremdstoff-Gabe deutliche und signifikant höhere EROD- und ECOD-Umsätze. Nach Verabreichung der Mitogene Fluoren und Fluorenon kam es zu einem deutlichen Anstieg der EROD-, ECOD- und EMND-Aktivitäten in den Lebern sowohl der Kontrolltiere als auch der Transplantat-Empfänger. Ähnliche Effekte zeigten sich auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen. Die Gabe von Tetrachlorkohlenstoff, hingegen führte sowohl in den Lebern beider Tiergruppen als auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen zu einer massiven Reduktion der Modellreaktionen. Nach Verabreichung von Brombenzol war in den Lebern der Kontrolltiere und Transplantat-Empfänger eine signifikante Abnahme der EROD- und EMND-, nicht jedoch der ECOD-Umsätze zu verzeichnen. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen. Eine Verabreichung von Cadmium-Sulfat führte wiederum in den Lebern beider Tiergruppen zu einer starken Hemmung aller drei Modellreaktionen. Vergleichbar waren auch hier wieder die Effekte in den Transplantat-enthaltenden Milzen.

Insgesamt konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass Substanzen mit charakteristischen Effekten auf das CYP-System der Lebern, wie Leberzellmitogene, Zellgifte oder Schwermetalle, ähnliche Wirkungen auch auf die Transplantate ausüben. Die Leberzelltransplantate sind offenbar sowohl funktionell als auch hinsichtlich ihrer Beeinflussbarkeit durch Fremdschubstanzen der Leber außerordentlich ähnlich.

Die vergleichbare Reaktion auf Veränderungen des Stoffwechsels ist eine der vordergründigen Anforderungen an die Transplantate, insbesondere im Hinblick auf die Ansprüche, die im Rahmen einer Leberersatztherapie beim akuten oder chronischen Leberversagen an sie gestellt werden. Aus den vorliegenden Resultaten wird diese Fähigkeit ersichtlich.

3. EINLEITUNG

3.1. Organogenese der Leber

Leber, Gallenblase, Gallengänge, Milz und Pankreas entwickeln sich im ventralen bzw. dorsalen Mesenterium des embryonalen Vorderdarmes, dem späteren Bereich des Magens und des proximalen Duodenums. Als epitheliale Aussprossung des Urdarmes wächst die Leber hierbei in Form der Leberbucht in das ventrale Mesogastrium ein und drängt dieses auseinander, so dass die Leber hier ihren Bauchfellüberzug erhält. Die Leberbucht gliedert sich frühzeitig in eine kraniale *pars hepatica* und eine kaudale *pars cystica*, die zu einem Hohlorgan, der späteren Gallenblase heranwächst. Der größere obere Abschnitt stellt die eigentliche Leberanlage dar. Dieser Teil besteht aus soliden Epithelzellverbänden, die proliferieren und sich einerseits zu miteinander anastomosierenden Zellsträngen, den Leberzellbälkchen (dem späteren Parenchym) und andererseits zu Zellröhrchen (der späteren Auskleidung der intrahepatischen Gallenwege) formieren. Sinusoide aus Dotter- und Nabelvenen durchdringen die Leberzellbälkchen so, dass das typische Bild des Leberparenchyms entsteht. Aus dem Mesenchym des Mesoderms entstehen das Binde- und blutbildende Gewebe sowie die Ito- und die Kupffer-Zellen. Beide Anteile der Leberanlage besitzen von Anfang an einen gemeinsamen Ausführungsgang, den *ductus choledochus*.

Durch das schnelle Wachstum überschreitet die Leber bald die Grenzen des ursprünglichen ventralen Mesoderms und wölbt sich in die Bauchhöhle vor. Das Mesoderm an der Oberfläche der Leber entwickelt sich zum Peritonealüberzug, der die Leber mit Ausnahme der mit dem Zwerchfell verbundenen Fläche bedeckt (Waldeyer 2002).

3.2. Bau der Leber

Die Leber gilt aufgrund der Produktion der Galle als die größte Drüse des menschlichen Körpers. So ist sie wie andere Drüsen auch lobulär gegliedert. Das Stroma zwischen den einzelnen, aus polygonalen Zellen aufgebauten *lobuli* besteht speziesabhängig aus mehr oder weniger stark ausgeprägtem Bindegewebe (Tortora und Grabowski 1996; Linß und Fanghänel 1999). An den Stoßkanten zwischen 3-4 Leberläppchen liegen die periportalen Felder (Glissonsche Dreiecke), die räumlich betrachtet Kanäle sind. Diese enthalten als sogenannte Glissonsche Trias einen Ast der *vena portae*, einen Ast der *arteria hepatica* und einen Gallengang.

Die Leber läßt sich demzufolge in 4 strukturelle Systeme unterteilen:

- die Leberzellen,

- die ableitenden Gallenwege,
- das Blutgefäßsystem und
- das retikuloendotheliale System.

Diese Systeme sind eng miteinander verflochten und in ihrer Funktion aufeinander abgestimmt (Tortora und Grabowski 1996).

Hepatozyten sind ein- oft zwei-, selten dreikernig und in ihrer Form viereckig bis polygonal. Sie enthalten Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Peroxisomen und freie Polysomen in großer Zahl, was ihre Stoffwechselaktivität gut widerspiegelt. Als Produkte der intrazellulären Stoffsyntaxe und -speicherung liegen Glykogen- und Lipidgranula vor, sowie Lysosomen (Stoffabbau). Die Leberzellen sind zu einschichtigen Zellbalken aneinandergereiht, welche einer radiären Anordnung folgen. Räumlich gesehen handelt es sich um Zellplatten, die miteinander anastomosieren. Am Gallepol sind benachbarte Hepatozyten durch *zonulae occludentes et adhaerentes* verbunden, so dass zwischen ihnen die Gallekapillaren entstehen. Die *zonulae occludentes* wirken als Barriere für den Stoffaustausch zwischen den Gallekanälchen und dem Interzellularraum der Hepatozyten. Die Gallekanalikuli beginnen in der Peripherie der Azini und führen die Galle entgegen dem Blutstrom zum Azinuszentrum, wo sie in die *ductuli interlobulares biliferi* münden. Diese schließen sich zu größeren Gängen zusammen, die schließlich als *ductus hepatici dexter et sinister* die Leber an ihrer Pforte verlassen. An dieser Stelle beginnen die extrahepatischen Gallenwege (Tortora und Grabowski 1996; Linß und Fanghänel 1999).

Die Leberläppchen beziehen ihr Blut sowohl aus der *vena portae* als auch aus der *arteria hepatica*. Die Pfortader enthält dabei das Blut aus dem Magen-Darm-Kanal. Durch mehrfache Teilung entstehen die *venae interlobulares*, die ihr Blut in ein präkapilläres Gefäßnetz an der Läppchenoberfläche und von hier in die Kapillaren zweier benachbarter Läppchen abgeben. Diese sind sinusartig und verlaufen zwischen den Leberzellplatten radiär zur Mitte des Läppchens bis zur *vena centralis*, die sich mit anderen Zentralvenen außerhalb des Läppchens zu Sammelvenen vereinigt. Aus deren Vereinigung entstehen schließlich 2-3 *venae hepaticae*, die ihr Blut in die *vena cava inferior* ergießen (Tortora und Grabowski 1996; Linß und Fanghänel 1999; Abbildungen 1 bis 3).

Insgesamt erfolgt die Blutversorgung mit etwa 300 ml pro Minute über die *arteria hepatica* und etwa 1200 ml pro Minute über die *vena portae*, die etwa 70% des von der Leber benötigten Sauerstoffes zur Verfügung stellt. In den oben erwähnten Sinusoiden findet der Stoffaustausch statt, der durch das Fehlen einer Basallamina erleichtert wird. Zwischen Endothel und den Hepatozyten befindet sich ein perikapillärer Spalt, der Dissésche Raum.

Durch Lücken im Endothel kann Blutplasma ungehindert austreten. Zum intensiveren Stoffaustausch ist die Oberfläche der Leberzellen durch Mikrovilli vergrößert. Insgesamt besteht die Leber aus etwa 70% Hepatozyten und 30% Nichthepatozyten. Zu letzteren gehören die Kupffer-, Ito-, Pit- und Endothelzellen, aber auch Fibroblasten und aus dem Blut stammende Leukozyten. Die Kupfferzellen sind ortsständige Monozyten, deren Bestand durch Mitose und Zuwanderung aus dem Knochenmark sichergestellt wird. Im Disséschen Raum befinden sich neben Ito-Zellen, die Fette und Vitamin A speichern, auch Pit-Zellen, deren Bedeutung noch unklar ist. Alle diese Zellen werden unter dem Begriff der sinusoidalen Funktionseinheit zusammengefasst (Tortora und Grabowski 1996; Linß und Fanghänel 1999). Neben der Beschreibung des lobulären Aufbaus gibt es noch das Konzept des Leberazinus als Funktionseinheit. Nach Rappaport ist der Azinus ein Parenchymzellverband, der um die terminalen afferenten Gefäße (arteriell und portal) orientiert ist. Zusammen mit den Gallekanalikuli bilden diese Gefäße die Achse des Azinus, von der aus er mit Blut versorgt wird. Am Rand des Azinus liegen die terminalen Venolen, die als Auffanggefäße mehrerer angrenzender Azini dienen (Tortora und Grabowski 1996; Linß und Fanghänel 1999). Ein drittes Einteilungsprinzip ist das des portalen Läppchens. Die Sauerstoffversorgung des Lebergewebes erfolgt von den Endästen der *arteria hepatica* und der *vena portae*. Mit zunehmender Entfernung vom periportalen Feld aus nimmt sie kontinuierlich ab. Somit wird die periportale (afferente oder proximale) Zone mit sauerstoff-, substrat- und hormonreichem Blut versorgt, während die perivenöse (perizentrale, zentrilobuläre, efferente oder distale) Zone mit Blut perfundiert wird, das einen niedrigeren Sauerstoff-, Substrat- und Hormongehalt besitzt, aber mit Kohlendioxid und mit anderen Stoffwechselprodukten angereichert ist (Tortora und Grabowski 1996; Linß und Fanghänel 1999). Abhängig von der Distanz zum periportalen Feld gibt es auch eine unterschiedliche Enzymausstattung der Leberzellen (siehe z.B. Klinger et al. 1986; 1988; Bass 1990; Gebhardt 1992; Jungermann und Kietzmann 1996; Miyanaka et al. 1998; Oinonen and Lindros 1998; Quondamatteo et al. 1998; Pronko et al. 2002).

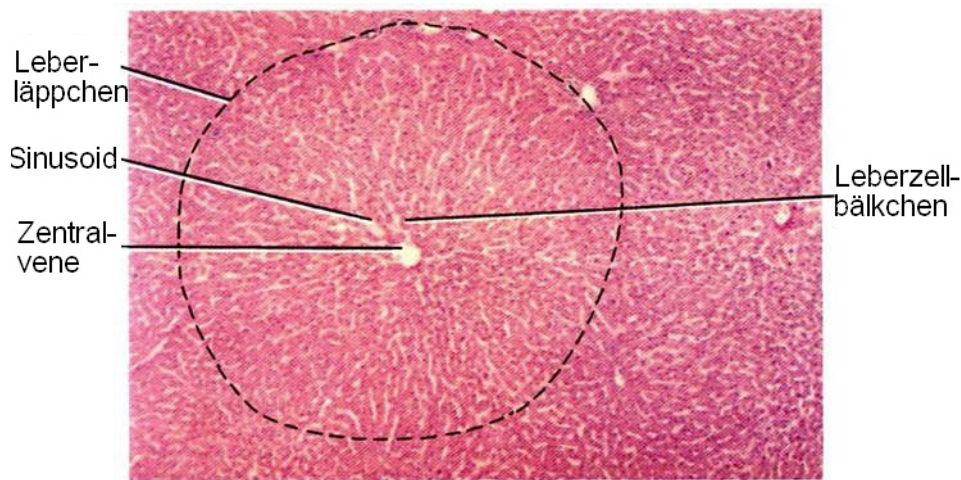


Abbildung 3: Histologisches Präparat einer Leber (Hämatoxylin/Eosin-Färbung, 16-fache Vergrößerung; nach Tortora und Grabowski 1996).

3.2.1. Unterschiede zwischen Ratten- und Menschenleber

Die Leber der Ratte zeigt im Vergleich zur der des Menschen einige morphologische Besonderheiten. So unterteilt sich das Organ der Tiere in fünf Leberlappen, in einen rechten medialen und lateralen Lappen, links in einen medialen und lateralen Lappen sowie einen Lobus caudatus. Die einzelnen Gallengänge dieser Lappen vereinigen sich zum *ductus choledochus*, der dann ins Duodenum mündet. Des Weiteren besitzt die Ratte keine Gallenblase. Lage und Organe, mit denen die Rattenleber in Kontakt tritt, entsprechen etwa denen der menschlichen Leber.

In die *vena cava* münden beim durchqueren der Leber entsprechend der Läppchenanzahl sieben Segmentalvenen. Ventral der *vena cava* treten die *arteria hepatica* und die Pfortader in das Organ ein. Adrenerge sympathische Nervenfasern verlaufen mit den interlobulären Blutgefäßen. Bis auf wenige Ausnahmen treten diese Nervenfasern im Gegensatz zu denen der menschlichen Leber nicht in die Leberläppchen ein und haben somit keinen Kontakt mit den Hepatozyten (Sharp und LaRegina 1998).

3.3. Physiologie der Leber

Die Leber ist das zentrale Kontrollorgan des Intermediärstoffwechsels. Über den Pfortaderkreislauf (*v. portae*) nimmt die Leber den überwiegenden Teil der aus dem Verdauungstrakt resorbierten Stoffe auf, gibt sie – sofern nicht ein vollständiger Abbau erfolgt – nach Speicherung bzw. Umbau wieder an den Kreislauf ab und verwandelt dadurch

die diskontinuierliche Aufnahme der Nährstoffe in eine kontinuierliche Versorgung des Gesamtorganismus mit Syntheseprodukten (Aminosäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide). Die Leistungen der Leber im Stoffwechsel lassen sich wie folgt zusammenfassen (Löffler und Petrides 2003):

- **Aminosäure-, Stickstoff- und Proteinstoffwechsel:** Synthese, Umbau und Abbau von Aminosäuren, Synthese von Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, teilweise der Blutplasmae Proteine und der Gerinnungsfaktoren.
- **Lipidstoffwechsel:** Synthese und Abbau von Fettsäuren, Triglyceriden, Phospholipiden, Cholesterin und Lipoproteinen.
- **Kohlenhydratstoffwechsel:** Speicherung und Mobilisierung von Glykogen, Neubildung, Umbau und Metabolisierung von Glucose, Galaktose, Fructose, Glucuronsäure und anderen Monosacchariden.
- Zu den Stoffwechselleistungen der Leber gehört auch die **Bildung der Gallenflüssigkeit** und damit die Bildung und Ausscheidung von Gallensäuren und Gallenfarbstoffen.

Eine weitere wesentliche Aufgabe ist die **Biotransformation** von körpereigenen Stoffwechselzwischen- und -endprodukten sowie von Fremdstoffen, d.h. die Verwandlung von vom Körper nicht ausscheidbaren lipophilen Substanzen in wasserlösliche, durch die Niere oder die Galle eliminierbare Stoffe.

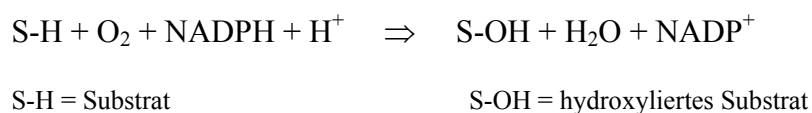
3.3.1. Biotransformation

Im menschlichen Organismus unterliegen sämtliche Nährstoffe ebenso wie die für den Körper *a priori* nicht verwertbaren Fremdstoffe (Xenobiotika), zu welchen auch Arzneimittel und Gifte zählen, den Vorgängen der Elimination. Hierbei spielt vor der eigentlichen Ausscheidung die Biotransformation, d.h. der enzymatische Umbau der Substanzen, eine zentrale Rolle. Das Hauptorgan, in dem dieser Prozess abläuft ist die Leber, jedoch finden sich die Enzymsysteme, die an der Biotransformation beteiligt sind, in geringerer Konzentration auch in anderen Organen wie z.B. dem Darm, der Niere, der Lunge, der Milz, der Muskulatur und dem Blut (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; 2000). Die dabei entstehenden Metabolite können unwirksam oder ebenfalls wirksam sein, gelegentlich ist jedoch erst der Metabolit aktiv. Zum Teil kommt es zur Giftung, d.h. körperschädliche Abbausubstanzen entstehen. Man unterscheidet zwei Arten von Biotransformationsreaktionen: Phase-I- oder Funktionalisierungsreaktionen sowie Phase-II-Reaktionen, welche als Konjugationen bezeichnet werden. Das Prinzip der Phase-I-

Reaktionen besteht im Einbringen oder dem Freilegen funktioneller Gruppen am Substrat, wodurch diese meist von einem lipophilen in einen hydrophilen, konjugationsfähigen Zustand überführt werden. Phase-I-Reaktionen umfassen am häufigsten Oxidationen (als solche können auch die N-, O- und S-Dealkylierung betrachtet werden, da sie mit einer C-Hydroxylierung beginnen), Reduktionen sowie Hydrolysen (auch Hydratationen, Isomerisationen u.a.). Sie werden hauptsächlich durch mikrosomale Enzyme, unter denen das Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasesystem die wichtigste Rolle spielt, realisiert. Die entstandenen Metabolite können dann den Konjugationsreaktionen zugeführt werden, in denen sie an Reste des Intermediärstoffwechsels wie Glucuronsäure, Glutathion, Schwefelsäure u.a. gekoppelt werden. In diesem 2. Reaktionsschritt entstehen die eigentlich eliminierbaren, zumeist biologisch inaktiven und hydrophilen Produkte, die nun letztendlich über die Gallenflüssigkeit oder den Harn ausgeschieden werden können.

3.3.2. Das Cytochrom P450-System

Im Zentrum der Phase-I-Reaktion steht eine Gruppe von Monooxygenasen, die 1955 von Mason et al. als „mixed functional oxidases“ benannt wurden. Diese realisieren neben anderen Oxidasen und Dioxygenasen den Hauptteil sämtlicher Oxidationsreaktionen im menschlichen aber auch im Ratten-Organismus. Die Enzymgruppe der Monooxygenasen wird zum kleineren Teil aus Flavinmonooxygenasen gebildet, den größten Anteil nimmt jedoch eine Familie an Hämproteinen ein, die als Cytochrom P450 (CYP) bezeichnet werden. Diesen ist gemeinsam, dass sie aus molekularem Sauerstoff (O₂) ein Atom auf das Substrat übertragen und das andere an Wasserstoff, welcher aus NADPH+H⁺ entstammt, zu Wasser reduzieren. Das Reaktionsprinzip lautet wie folgt:



Aus dieser doppelten Funktion wurde die Bezeichnung mischfunktionelle Oxygenasen hergeleitet. CYP gehört zu den am Membransystem des endoplasmatischen Retikulums gebundenen Enzymen, die bei der fraktionierten Zentrifugation in Form von Membranstücken, den sogenannten Mikrosomen, sedimentieren, weshalb ihnen die Bezeichnung „mikrosomale Enzyme“ verliehen wurde. Die Zahl 450 hat CYP von seiner Fähigkeit, Licht einer Wellenlänge von 450 nm (nach Reduktion mit Natriumdithionit und Equilibrierung mit CO) besonders stark zu absorbieren, zu verdanken. Eine zentrale Rolle bei

der Biotransformation spielt auch eines der wichtigsten Enzyme für Reduktionsreaktionen, die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase. Sie dient als Lieferant für die Reduktionsäquivalente, die CYP bei den verschiedensten Funktionalisierungsreaktionen benötigt (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; 2000).

Das CYP ist die terminale Oxidasenkomponente eines elektronenübertragenden Systems, welches sich, wie oben erwähnt im endoplasmatischen Retikulum befindet und ein Häm-Protein ist, welches Eisen-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe besitzt (Abbildung 4). Das CYP-System besteht aus einer ganzen Familie von Isoenzymen, die sich in ihren Molekulargewichten (ca. 45000-55000 Dalton), ihren Aminosäuresequenzen, ihrer Induzierbarkeit und ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten unterscheiden. Die einzelnen Isoenzyme unterteilt man anhand ihres Homologiegrades (Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen) in einzelne Familien. Bei einem Anteil von mehr als 40% gleicher Sequenzen werden die Enzyme einer Familie zugeordnet, bei geringerem Ähnlichkeitsgrad liegt eine andere Familie vor. An der Verstoffwechselung von Fremdstoffen sind vor allem die Enzyme der Familien 1 bis 4 beteiligt (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; 2000). Die einzelnen Familien werden wiederum in Sub- oder Unterfamilien (A, B, ...) untergliedert (Zuordnungsgrenze: 70% gleiche Aminosäuresequenzen), in die schließlich die individuellen Enzyme eingeordnet werden. Daraus leitet sich die heute international empfohlene Nomenklatur der CYP-Gene und ihrer dazugehörigen Enzyme, z.B. CYP1A1, CYP2A2, CYP3A4 usw., ab (Nelson et al. 1993).

Seit ihrer Erstbeschreibung in den späten 60iger Jahren hat sich die Zahl der bekannten CYP-Formen stetig erhöht: waren 1987 noch 65 verschiedene Enzyme bekannt, beschrieben Nelson und Mitarbeiter 1993 bereits 221 CYPs bei 11 Säugetierorganismen und 3 Pflanzen. 1996 ist bei Lewis schon von über 300 Formen die Rede und jedes Jahr kommen neue hinzu (Degtyarenko und Fábíán 2004). Beim Menschen sind über 30 unterschiedliche CYP-Isoformen mit verschiedenen, zum Teil überlappenden Eigenschaften bekannt (Gibson und Skett 1994; Degtyarenko und Fábíán 2004). Das Hauptenzym in der Leber scheint bei der Mehrheit der Menschen mit einer gewissen interindividuellen Variation das CYP 3A4 zu sein (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; 2000; Degtyarenko und Fábíán 2004).

Aufgrund von Sequenzhomologien kann man orthologe CYP-Formen bei Ratte und Mensch miteinander vergleichen (Soucek und Gut 1992), jedoch gibt es hinsichtlich des Metabolismus endogener und exogener Substrate einige Unterschiede zwischen ihnen (Lewis 1996; 2000). Die metabolischen Aktivitäten der Rattenenzyme sind hierbei weitaus umfassender erforscht als die des Menschen.

In Tabelle 1 werden einige, in der menschlichen Leber und anderen Geweben vorkommende CYP-Enzyme mit ihren typischen Substraten, ihrer Induzierbarkeit und ihrer Homologie zu den orthologen Formen der Ratte aufgeführt.

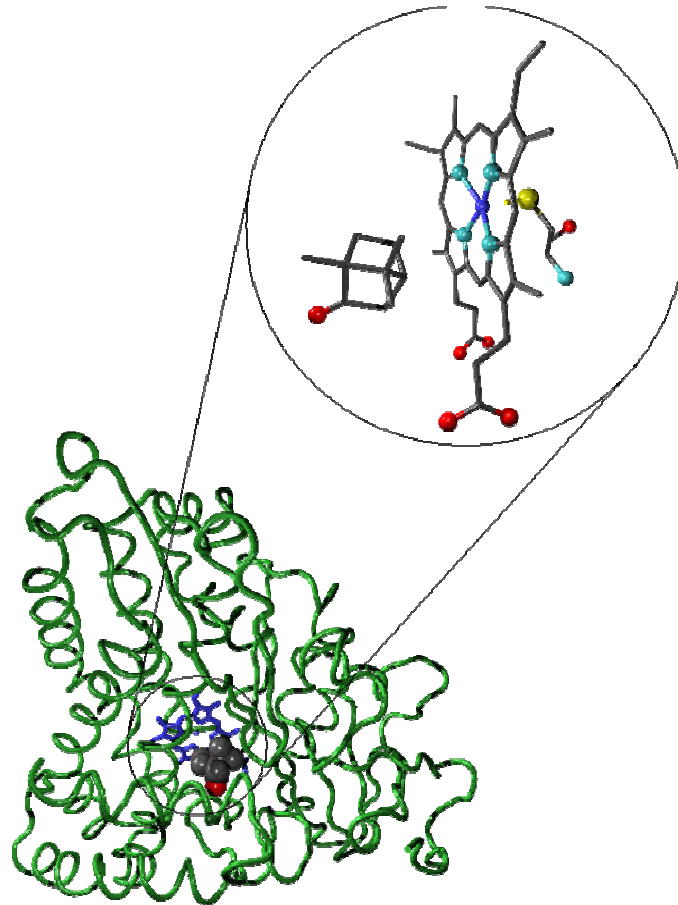


Abbildung 4: Strukturmodell des Cytochrom P450cam mit gebundenem Kampfer (Segall 2004).

Tabelle 1: Am Fremdstoffwechsel des Menschen beteiligte CYP-Enzyme (nach Gonzales 1992; Soucek und Gut 1992).

CYP	Gewebe	Induzierbarkeit	Typische Substrate*	Ratten-orthologon	Homologie in %
1A1	Diverse	Ja	aromat. KW***	1A1	78
1A2	Leber	Möglich	Coffein	1A2	70
2A6	Leber	Möglich	Coumarin	2A3	85
2B6	Leber	Möglich		2B1	74
2B7	Lunge			2B1	76
2C9	Leber, Darm		Tolbutamid	2C11	77
2E1	Leber, Darm, Leukozyten	Ja	Ethanol	2E1	78
3A3	Leber	Ja	Cyclosporin	3A1	78
3A4	Leber, GIT**	Ja	Nifedipin	3A1	73
3A5	Leber, Placenta		Cyclosporin	3A2	71
3A7	Fötale Leber		Testosteron	3A2	65
4B1	Lunge			4B1	80
* zum Teil mehr als 1 Substrat **: Gastrointestinaltrakt ***: Kohlenwasserstoffe					

Die Abbildung 5 zeigt die Stadien, welche ein Substrat S bei der CYP-vermittelten Hydroxylierung durch molekularen Sauerstoff durchläuft sowie den jeweiligen Redoxstatus des Häm-Eisens. Zunächst wird das Substrat an das CYP gebunden, wobei das Eisen in oxidierter Form (3^+) vorliegt. Daran schließt sich die Übertragung eines Elektrons auf das Eisen, bei der ein Flavoprotein und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ mitwirken, an, wodurch dieses im CYP nun zweiwertig vorliegt (1. Reduktion). Der dritte Schritt ist die Anlagerung eines Sauerstoff-Moleküls und die Aufnahme eines weiteren Elektrons (2. Reduktion, Schritt 4), wodurch beide Moleküle des Sauerstoffs aktiviert werden. In dem nun folgenden Schritt zerfällt der Substrat-CYP-Sauerstoff-Komplex unter Bildung eines hydroxylierten Substrates, Wasser und dem regenerierten CYP mit wieder dreiwertigem Häm-Eisen (Lewis 1996; 2000).

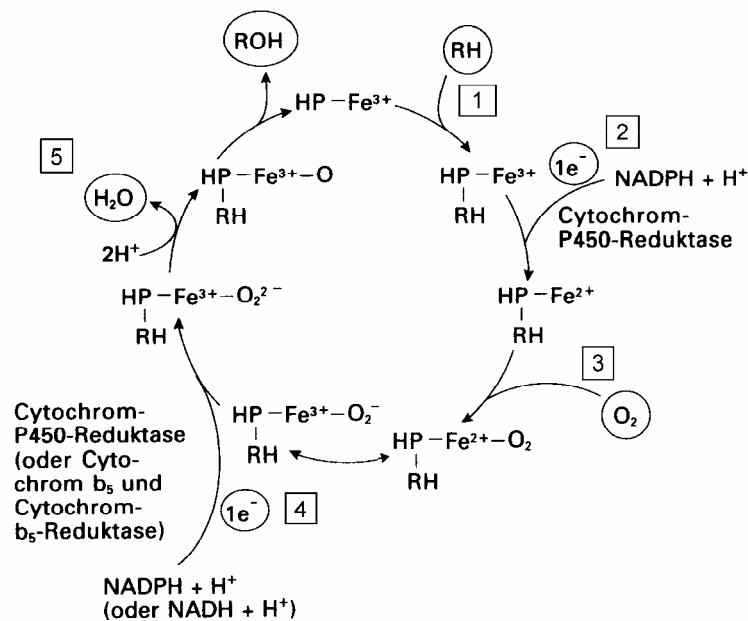


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Reaktionszyklus am Cytochrom P450 (nach Marquardt und Schäfer 2003).

3.3.3. Beeinflussung des Cytochrom P450-Systems durch körpereigene Substanzen und durch Fremdstoffe

Die einzelnen CYP-Isoformen liegen *in vivo* in unterschiedlichen Gesamtmengen vor. Die Gründe hierfür sind vielfältig. So ist die Aktivität der einzelnen CYPs zum einen abhängig von deren genetisch festgelegten Basalmenge, zum anderen auch von der Anwesenheit bestimmter induktionsfördernder oder hemmender Einflüsse. Unterschiedlichste Faktoren beeinflussen und regulieren die jeweilige CYP-Aktivität in verschiedenem Ausmaß. So interagieren zum Beispiel Hormone oder exogene Substanzen direkt oder indirekt mit verschiedenen Regulationsmechanismen (z.B. Rezeptor- oder Repressor-Proteinen) der CYP-Gene.

Einige dieser Regulationsmechanismen sind nahezu vollständig erforscht. Bislang kennt man 5 verschiedene Hauptmechanismen der Enzyminduktion (Fuhr 2000; Rushmore und Kong 2002; Willson und Kliewer 2002; Handschin und Meyer 2003; Pascussi et al. 2003; Wang und LeCluyse 2003). Bei der Induktion vom Typ der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe binden Induktoren wie Benzo(a)pyren, Dioxine (TCDD), 3-Methylcholanthren oder β -Naphthoflavon an einen spezifischen, im Zytosol befindlichen Rezeptor, genannt Ah-(aryl

hydrocarbon) Rezeptor. Dieser Komplex aus Induktor und Rezeptor wird nun zusammen mit einem weiteren Protein (Ah receptor nuclear translocator – ARNT) in den Zellkern transportiert, wo er sich an eine Regulatorregion des CYP1A1 und 1A2 anlagert und die Transkription der entsprechenden mRNA erhöht, was nach entsprechender Translation zu steigenden Konzentrationen an den entsprechenden Enzymen führt. Die Induktion vom Ethanol-Typ basiert hauptsächlich auf einer Stabilisierung des Enzyms. Betroffen ist hier das CYP2E1. Die Liste der Induktoren umfasst neben Ethanol eine Reihe von organischen Lösungsmitteln, wie Aceton und Xylol, aber auch das Tuberkulostatikum Isoniazid. Zwei weitere Substanzklassen, die Fibrate und die Glitazone, binden an sogenannte „peroxisome proliferator activated receptors“ (PPARs), PPAR α und PPAR γ . PPAR α ist nach Translokation in den Zellkern und Bildung eines Heterodimers mit dem „retinoid X receptor“ (RXR) in die Transkription von Genen involviert, die für Proteine kodieren, die den Lipoprotein- und Lipidmetabolismus steuern. Induziert wird dabei auch die CYP4A-Familie. PPAR γ kontrolliert unter anderem die Differenzierung von Fettzellen und die Adipogenese. Phenobarbital war eine der ersten Substanzen von denen bekannt war, dass sie zu einer Erhöhung der CYP-Expression führen können. Beim Menschen wird hierbei der stärkste Einfluss auf das CYP2B6 ausgeübt, aber auch CYP1A2, 2C8, 2C9 und CYP3A4 werden induziert. Vor kurzem wurden die Rezeptoren für diesen Typ der CYP-Induktion genauer klassifiziert. Man stellte fest, dass Phenobarbital und ähnliche Substanzen, wie z.B. Phenytoin, Carbamazepin und Primidon, an einen zytosolischen, sogenannten „constitutive androstane receptor“ (CAR) binden. Dieser wiederum bildet nach Translokation in den Zellkern einen Heterodimer mit dem RXR, welcher dann an die Promotorregionen der CYP-Gene bindet. Die Induktion vom Rifampicin/Glukokortikoid-Typ wird über einen weiteren zytosolischen Rezeptor, den „pregnane X receptor“ (PXR), vermittelt, der ebenfalls mit dem RXR dimerisiert und z.B. an die Promotorregion des CYP3A4-Gens bindet.

Auch hormonelle Veränderungen im Laufe der Entwicklung eines Organismus können zur Veränderung von CYP-Aktivitäten führen. Während der Geschlechtsentwicklung auftretende erhöhte Geschlechtshormon-Konzentrationen, aber auch ein geschlechtsspezifisch unterschiedliches Wachstumshormon (GH)-Sekretionsmuster führen zu einer Zu- oder Abnahme der Expression bestimmter CYP-Isoformen. So finden sich z.B. in den Lebern adulter männlicher Ratten höhere CYP2B1-, 2B2-, 2C11-, 2C13-, 2D1-, 3A1- oder 3A2-Aktivitäten als in weiblichen Tieren, wohingegen in weiblichen Ratten z.B. vermehrt CYP1A2, 2A1, 2C12 oder 2E1 gebildet wird (Westin et al. 1990; Legraverend et al. 1992a; 1992b; Waxman 1992; Shapiro et al. 1995; Waxman et al. 1995; Shimada et al. 1997;

Agrawal und Shapiro 2000; 2001; Kawai et al. 2001; Pampori et al. 2001). Auch Schilddrüsen-Hormone nehmen Einfluss auf die CYP-Expression, wobei die Wirkungen auf die verschiedenen CYP-Isoformen unterschiedlich zu sein scheinen (Goudonnet et al. 1990; Murayama et al. 1991; Ram und Waxman 1991; Gibson und Skett 1994; Rosenberg et al. 1995).

Neben der Induktion mit gesteigerten Aktivitäten kann auch eine Hemmung des CYP durch verschiedene Xenobiotika beobachtet werden. Diese kann auf völlig verschiedenen Mechanismen, wie beispielsweise der Hemmung der Enzymsynthese, der Herstellung veränderter CYPs mit geringerer Aktivität oder auch der kompetitiven oder irreversiblen Hemmung der CYPs selbst, beruhen (Gibson und Skett 1994).

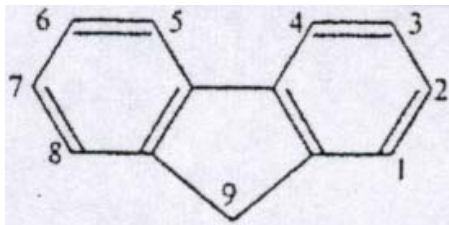
Metall-Ionen wie Cobalt, aber auch Nickel und Platin, nehmen auf die CYP-Aktivität auf zweierlei Weise Einfluss. Einerseits führen sie über eine Hemmung der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase und damit einer reduzierten Häm-Synthese zu einer verminderten Produktion von CYPs, andererseits erhöhen sie den CYP-Katabolismus durch eine Steigerung der Aktivität der Häm-Oxygenase (Maines und Kappas 1976; 1977; Sasame und Boyd 1978; Maines 1981; Hoshi et al. 1989; Gibson und Skett 1994; Kaliman et al. 2001). Insgesamt führt Cobalt so zu einem sinkenden intrazellulären Gehalt an Häm und CYP und damit zu verminderten CYP-Aktivitäten (Maines und Kappas 1976; 1977; Maines 1981; Sasame und Boyd 1978; Gibson und Skett 1994; Hoshi et al. 1989; Kaliman et al. 2001). Andere Metallionen nehmen auch Einfluss auf die CYPs, indem sie das Redoxpotential derart verändern, dass ein Elektronentransfer nur erschwert möglich ist und so die Enzymaktivität sinkt (Lewis 1996; 2000).

Manche Xenobiotika, die über eine Nitrogruppe oder ein reaktives Kohlenstoffatom verfügen, formen nach metabolischer Aktivierung inaktive Komplexe mit CYP, so dass keine weitere katalytische Aktivität mehr besteht. Sogenannte Suizidsubstrate, deren funktionelle Gruppen eine Olefin- oder Acetylen-Struktur besitzen, sind primär eigentlich relativ inert und werden in der Regel erst durch das CYP-System aktiviert. Danach binden sie irreversibel am CYP, wobei die Hämgruppe zerstört wird und nur durch eine Neusynthese die ursprüngliche Enzymaktivität wieder erreicht werden kann (Gibson und Skett 1994).

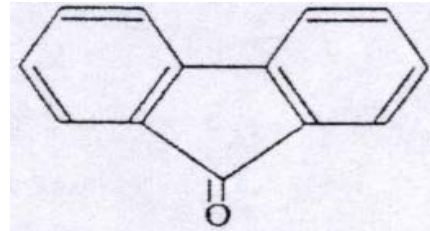
Schließlich blockieren bestimmte Substanzen die Bindungsstellen für die Redoxpartner der CYPs und stören so die Interaktion zwischen beiden, so dass das CYP nicht regulär regeneriert werden kann. Auf gleiche Weise scheinen spezifische CYP-Antikörper die Enzymaktivität zu mindern (Gibson und Skett 1994).

3.4. In der vorliegenden Arbeit eingesetzte Testsubstanzen

3.4.1. Fluoren (FEN) und Fluorenon (FON)



Fluoren (FEN)



Fluorenon (FON)

Abbildung 6: Strukturformeln von Fluoren und Fluorenon.

Fluoren (FEN) und Fluorenon (FON) sind trizyklische Kohlenwasserstoffe mit den Summenformeln $C_{13}H_{10}$ bzw. $C_{13}H_8O$. Die beiden Substanzen gehören zu den sogenannten polyzyklischen Kohlenwasserstoffen. Polyzyklische Kohlenwasserstoffe entstehen typischerweise bei unvollständig ablaufenden Verbrennungsvorgängen organischer Materialien und anderen pyrolytischen Prozessen und werden dadurch in die Umwelt eingetragen. Diese Prozesse finden weltweit statt und führen zu einem ubiquitären Vorkommen der Chemikalien in biotischen und abiotischen Umweltkompartimenten. FEN ist hierbei eine der 16 bedeutendsten Einzelsubstanzen, die von der „United States Environmental Protection Agency“ als Leitsubstanzen für umweltanalytische Untersuchungen vorgeschlagen wurden. Sowohl FEN als auch FON sind als potente Mitogene für Rattenleberzellen, aber auch für andere Gewebe (z.B. die Nebennierenrinde), bekannt (Danz et al. 1992; 1998). In Langzeitstudien wurden FEN und FON als nicht kanzerogen klassifiziert, obwohl einige Derivate beider Verbindungen, wie 2-Acetylaminofluoren und 2,4,7-Trinitrofluorenon, eine starke Kanzerogenität besitzen (Danz und Bräuer 1988; Hadjiolov et al. 1995). Im Rahmen von Kanzerogenitätsstudien wurde an Ratten nach Exposition mit FEN (35-400mg/kg Körpergewicht) und FON (50-150mg/kg Körpergewicht) eine signifikante Lebervergrößerung sowie eine signifikante Erhöhung des hepatischen Mitoseindexes beobachtet (Danz et al. 1992). Weiterhin führte FON zu einer Zunahme der Aktivitäten bestimmter CYP-vermittelter Monooxygenase-Modellreaktionen, wie der Ethoxyresorufin- und Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (Danz et al. 1992). Diese Effekte wurden als enzyminduzierende Eigenschaft der Substanz interpretiert, ähnlich wie zuvor

bereits für das FEN und die CYP-Familien 1A und 2B beschrieben (Aström et al. 1986; Ayrton et al. 1990; Chaloupka et al. 1995).

3.4.2. Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄)

Tetrachlorkohlenstoff, auch Tetrachlormethan genannt, ist ein halogener Kohlenwasserstoff. CCl₄ ist ein klassisches Substrat von CYP, speziell der Isoformen 2B und 2E. Das Lösungsmittel besitzt stark hepato- und nephrotoxische Eigenschaften. Diese gewinnt es jedoch erst durch sogenannte Giftung zum Trichlormethylradikal am CYP-System, insbesondere durch CYP2E1, aber auch durch CYP2B-Isoformen (siehe z.B. Lauriault et al. 1992; Raucy et al. 1993; Allis et al. 1996; Gruebele et al. 1996; Kim et al. 1996; Nakajima 1997; Wong et al. 1998; Zangar et al. 2000; Takahashi et al. 2002; Weber et al. 2003), wobei es nach seiner Metabolisierung mit dem Enzym irreversibel reagieren kann und es dadurch zerstört („suicide substrate“). Das durch Giftung gebildete Trichlormethylradikal ist in der Lage, aus anderen Verbindungen, wie ungesättigten Fettsäuren, Wasserstoffatome zu abstrahieren (Muriel 1997; Plaa 1997; Weber et al. 2003). Die Abspaltung eines Wasserstoffatoms führt zur Entstehung von Lipidradikalen, welche mit Sauerstoff zu Lipidmonohydroperoxiden reagieren und spontan, durch Erwärmen oder durch Metallkatalysatoren eine Kettenreaktion in Gang setzen können (Muriel 1997; Sevanian und McLeod 1997). Im Verlauf der Kettenreaktion entstehen Endprodukte, wie Ethan, n-Pentan oder Malondialdehyd (Frankel 1983; Muriel 1997; Sevanian und McLeod 1997). Die Kettenreaktion wird gestoppt, wenn zwei Radikale miteinander reagieren.

Die gestörte β -Oxidation der Fettsäuren führt in der Leberzelle zur Anhäufung von Lipiden, die freien Radikale teilweise zu Eiweißdenaturierung. Histologisch sichtbar ist dann eine vor allem zentrilobulär betonte Leberzellverfettung und -nekrose (Recknagel und Glende 1973; Groothuis et al. 1983; Lindros et al. 1990; Berman et al. 1992; Jahn et al. 1993; Wang et al. 1997; Weber et al. 2003).

3.4.3 Brombenzol (BBZ)

Monobrombenzol, C_6H_5Br (auch Phenylbromid), ist eine farblose, geruchlose, wasserunlösliche Flüssigkeit mit einem Molekulargewicht von 157,01 Dalton.

Nach Resorption wird Brombenzol in der Leber CYP-abhängig in ortho- oder para-Bromphenol überführt. Durch weitere CYP-vermittelte biochemische Prozesse entstehen schließlich im Sinne einer Giftung zytotoxische Zwischenprodukte wie Quinone und 3,4-Epoxide, die teilweise durch Glutathion entgiftet werden können (Jollow et al. 1974; Lau und Zannoni 1981; Monks et al. 1983; Harauchi und Hirata 1994). Wenn der zelluläre Gehalt an Glutathion aufgebraucht ist, binden die toxischen Metabolite zum einen kovalent an Leberproteine (Proteinalkylierung), zum anderen führen sie zur Lipidperoxidation (Casini et al. 1985; 1987; Pompella et al. 1987; Rombach und Hanzlik 1999). Neben einem parallel gestörten Ca^{2+} -Haushalt (Casini et al. 1987) ist die Lipidperoxidation die Hauptursache für einen Verlust der Membranintegrität von Hepatozyten. Das Absterben von Leberzellen wird aber auch durch Proteinalkylierung mit konsekutiver Verklumpung des Chromatins sowie durch eine Verursachung von DNS-Strangbrüchen gefördert (Oraumbo und Van Duuren 1987; 1989; Wu et al. 1997). Alle diese Prozesse münden in vornehmlich zentrilobulären Leberzellnekrosen (Casini et al. 1985; Klinger et al. 1986; Zhou et al. 1995; Lind und Gandolfi 1999; Giffen et al. 2002).

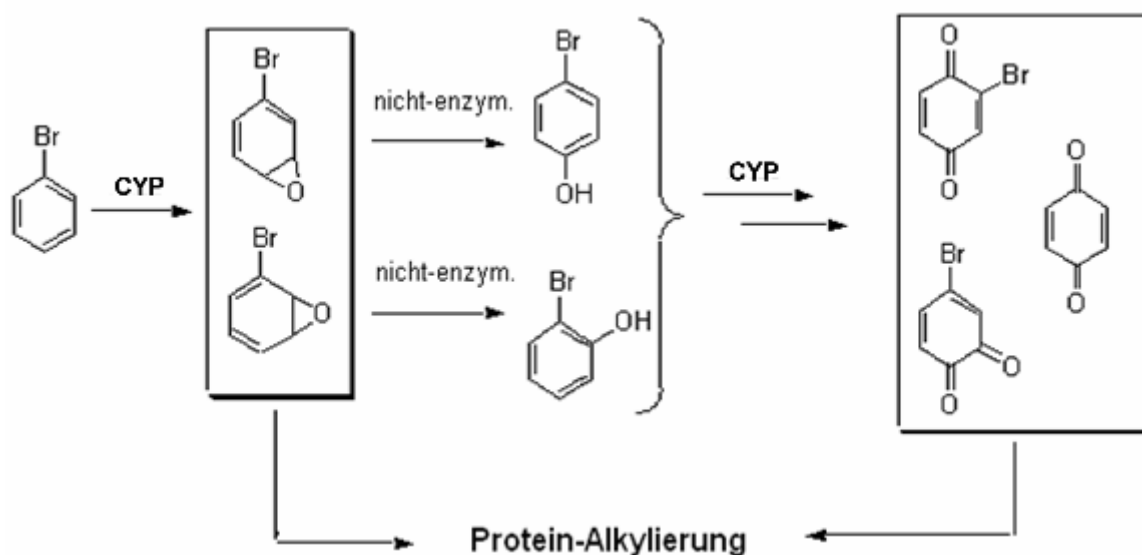


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Cytochrom P450-abhängigen Giftung von Brombenzol.

3.4.4. Cadmiumsulfat (CdSO_4)

Cadmium ist ein toxisches, biologisch nicht essentielles Schwermetall mit einer sehr langen Halbwertszeit von 10-30 Jahren (Cd ; Atomgewicht: 112,4; Oxidationsstatus 2^+). Es geht eine Reihe von Verbindungen ein, wie CdS , CdO , CdSO_4 oder CdCl_2 , wobei Cadmium-Sulfat eine der wasserlöslichen Verbindungen ist. Die Aufnahme erfolgt in der Regel über die Nahrung oder beruflich bedingt bzw. bei Rauchern inhalativ. Die höchste Konzentration wird in der Nierenrinde gefunden (ca. 33%), die Leber enthält ca. 20% des Körperbestandes. Nach Resorption bindet Cd^{2+} an anionische Gruppen, insbesondere an die Sulfhydrylgruppen des Metallothioneins oder Albumins. Das Proteingebundene Cd^{2+} wird in die Leber aufgenommen, wo es die Synthese von Metallothionein induziert. Cd^{2+} -Metallothionein wird glomerulär filtriert und in den Nierentubuli wieder reabsorbiert (Pinozytose). Nach der Aufnahme in die Tubuluszellen wird der Metall-Proteinkomplex metabolisiert. Die Ausscheidung erfolgt via Faeces (nur 5% der oral aufgenommenen Menge wird intestinal resorbiert) und renal. Die renale Cd^{2+} -Ausscheidung nimmt proportional zum Cd^{2+} -Körperbestand, also mit dem Alter zu (Marquardt und Schäfer 2003).

Cadmium gehört aufgrund seiner toxokinetischen Eigenschaften zu den Kumulationsgiften, akute wie chronische Intoxikationen sind beschrieben. Cd^{2+} -Ionen denaturieren Proteine und führen in hohen Dosen zu Schädigungen an Strukturen mit Grenzflächenfunktion wie z.B. den Lungen oder dem Mucosaepithel des Gastrointestinaltraktes. Hieraus können sich eine Pneumonitis, ein Lungenödem oder Erbrechen, Diarrhoe und kolikartige Bauchschmerzen ergeben. Weiteres „Zielorgan“ ist die Niere, bei der es nach chronischer Exposition mit Überschreitung der Grenzdosis zur Organinsuffizienz kommen kann. Auch das Entstehen einer Rhinitis, eines gelben Zahnsaums und die Entwicklung einer Osteomalazie (indirekter Effekt der Cd^{2+} -bedingten Nierenschädigung) sind beschrieben (Marquardt und Schäfer 2003). Der Einfluss einer einmaligen Vorbehandlung von Ratten mit verschiedenen Schwermetallsalzen auf die CYP-vermittelte Monooxygenasefunktion der Lebern wurde bereits von Kadiiska und Stoychev (1980), Kadiiska et al. (1983) und Jahn und Klinger (1982; 1989) untersucht. Hierzu setzten sie auch CdSO_4 ein, das in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht subkutan injiziert wurde. Die Tiere wurden 24 Stunden nach Gabe der Schwermetallsalze zur Organentnahme getötet. Die Ergebnisse zeigten, dass Cadmium-Sulfat signifikant die Aktivität der verschiedenen CYP-vermittelter Modellreaktionen, wie der Anilin-Hydroxylierung, der Ethylmorphin-N-Demethylierung, der Ethoxycoumarin-O-Deethylierung und der Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (als Zeichen für eine Hemmung der CYP-Familien 1A, 2A, 2B, 2C, 2E und 3A) deutlich verminderte. Der zugrundeliegende

Mechanismus könnte in der durch Krasny und Holbrook (1977; 1978) und Eaton et al. (1980) beobachteten Hemmung der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase und Aktivitätssteigerung der Häm-Oxygenase durch Cadmium begründet sein, wodurch einerseits die Syntheserate Häm-enhaltender Proteine wie der CYPs vermindert und andererseits deren Katabolismus verstärkt sein könnte.

3.5. Funktionsstörungen der Leber und therapeutische Ansätze

Die Leber ist, wie oben bereits erwähnt, ein an Komplexität kaum übertroffenes Organ, in dem mannigfaltige Synthese-, Metabolisierungs- und Eliminierungsprozesse stattfinden (z.B. Produktion und Umwandlung von Gerinnungsfaktoren sowie von Stoffwechselprodukten des Zucker-, Eiweiß-, und Fetthaushaltes; Produktion der Galle zur Ausscheidung von Bilirubin und Gallensäuren). Während man heute andere Organsysteme in deren Funktion partiell künstlich ersetzen oder unterstützen kann (z.B. im Falle der Nieren durch Dialyse), ist der Ersatz der Leberfunktion bislang auf einzelne Leistungen wie der Gerinnungsfaktoren-Substitution mittels fresh-frozen-plasma oder PPSB (Prothrombinkomplex) beschränkt. Techniken für eine kontinuierliche Unterstützung bestehen derzeit nicht oder sind wie die Plasmapherese zur Eliminierung von giftigen Substanzen wiederum nur auf Teilfunktionen ausgerichtet und in ihrer Wirkung limitiert. Allein die Transplantation des Organs stellt bei vielen Lebererkrankungen eine wirksame Therapie dar. Dies ist bei metabolischen Leiden wie dem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, aber auch bei Leberzirrhosen unterschiedlichster Genese (Hepatitis B und C, biliäre Zirrhose oder primär sklerosierende Cholangitis im Endstadium) der Fall. Dabei wurde festgestellt, dass Patienten mit Hämophilie als Grunderkrankung, die an einer transplantationspflichtigen Posttransfusionszirrhose litten, durch eine Lebertransplantation auch von ihrem Grundleiden geheilt wurden. Da es allerdings an Spenderorganen mangelt, ist diese Therapieoption jedoch stark limitiert.

Hieraus entstanden neue Überlegungen, wie die eigentliche Grunderkrankung zu einem viel früheren Zeitpunkt mit weniger aufwändigen und invasiven Mitteln behandelt werden könnte. Da bei den meisten Stoffwechselfunktionen hauptsächlich Hepatozyten die zentrale Rolle einnehmen, scheint der Ersatz der Leberfunktion durch eine bestimmte Mindestanzahl von isolierten Hepatozyten für einige Erkrankungen vorstellbar. Dies gilt insbesondere für solche Leiden, bei denen die pathophysiologische Störung auf der Ebene der Hepatozyten liegt. Je nach Krankheitsursache ist ein temporärer (z.B. beim akuten Leberversagen unterschiedlichster Ätiologie) oder der permanente (z.B. bei hereditären Lebererkrankungen)

Ersatz der Leberzellfunktion notwendig. Mögliche Indikationen für einen temporären oder permanenten Leberersatz sind in Tabelle 2 aufgelistet:

Tabelle 2: Mögliche Indikationen für einen temporären bzw. permanenten Leberersatz

Akutes Leberversagen	Angeborene metabolische Erkrankungen	Andere Erkrankungen
<ul style="list-style-type: none"> • Hepatitis A • Hepatitis B • Hepatitis C • Medikamenteninduziert wie durch Halothan, Isoniazid, Paracetamol • Intoxikation, z.B. durch Pilze (Knollenblätterpilz) 	<ul style="list-style-type: none"> • Alpha-1-Antitrypsinmangel • Morbus Wilson • Galaktosämie • Glycogenspeicherkrankheiten Typ I und IV • Protoporphyrurie • Familiäre/Homozygote Hypercholesterinämie • Crigler-Najjar-Hyperbilirubinämie Typ I 	<ul style="list-style-type: none"> • Perioperative Leberinsuffizienz • Traumatisch bedingte Leberinsuffizienz • Hereditärer Gerinnungsfaktorenmangel wie Hämophilie A/B

Für einen Leberersatz stehen prinzipiell mehrere Verfahrensmöglichkeiten zur Verfügung, bei denen sich drei Konzepte unterscheiden lassen:

1. *Extrakorporale Systeme nur zur Entgiftung:* Hämodialyse, Hämoabsorption mit Hilfe von Aktivkohle oder Austauschharzen, Plasmaseparation, Kreuzzirkulation und Verwendung von trägergebundenen mikrosomalen Enzymen.
2. *Transplantation von Hepatozyten oder Leberzellen im weiteren Sinne.*
3. *Biosynthetischer Kunstleberersatz und hybride Organe* (humane Hepatoblastom-Zellen in einem Dialysefiltersystem stationiert; Hohlfasermodule mit Schweinehepatozyten auf Kollagenmatrix).

Erstmals gelang die Transplantation von isolierten Hepatozyten an der Ratte durch Matas et al. (1975; 1976), Groth et al. (1977) und Sutherland et al. (1977a; 1977b). Seither wurde eine Vielzahl von Methoden durch unterschiedliche Arbeitsgruppen entwickelt, wobei Mäuse-, Ratten-, Hunde-, Schafe-, Schweine- oder Affenmodelle angewandt wurden (siehe z.B.

Sommer et al. 1979a; 1979b; Makowka et al. 1980; Baumgartner et al. 1983; Cuervas-Mons et al. 1984; Minato et al. 1984; Vroemen et al. 1986; Wiederkehr et al. 1990; Wilson et al. 1990; Chowdhury et al. 1991; Then et al. 1991; Xiangdong et al. 1991; Arkadopoulos et al. 1992; 1994; 1998; Ribeiro et al. 1992; Zhang et al. 1992; Holzman et al. 1993; Hagihara et al. 1994; Kokudo et al. 1995; Rozga et al. 1995; Overtuf et al. 1996; Schumacher et al. 1996; Vogels et al. 1996; Benedetti et al. 1997; Ikebukuro et al. 1999; Oren et al. 1999; Stefan et al. 1999; Dunn et al. 2000; Kim et al. 2000; Kobayashi et al. 2000; Sierra et al. 2000; Ambrosino et al. 2001; Cai et al. 2002; Guha et al. 2002; Kim et al. 2002; Song et al. 2002; Nagata et al. 2003).

Die zur Transplantation benötigten Hepatozyten werden gewonnen, indem nach Laparotomie Kollagenase enthaltende Lösungen über portalvenöse Katheter perfundiert werden und die abgelösten Zellverbände anschließend einer Dichtezentrifugation unterzogen werden, um die Hepatozyten von nichtparenchymatösen Zellen (z.B. Kupffer-Zellen) zu trennen (Seglen et al. 1976). Diese können dann bis zur Transplantation in tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt werden (Kusano et al. 1981; Fuller et al. 1983; Sawa et al. 1986; Maganto et al. 1990a; Dunn et al. 2000; Jamal et al. 2000; Spinelli et al. 2002), was einen weiteren Vorteil gegenüber der orthotopen Ganzleber-Transplantation darstellt. Auch fötale Leberzellen oder Lebergewebesuspensionen dienten als Transplantationsmaterial (Ebata et al. 1988; Borel-Rinkes et al. 1992; Kato et al. 1992; 1994; 1995; 1996; 1998; Suzuki et al. 2000).

Die Zellübertragung erfolgt entweder durch Injektion mittels einer Kanüle in das Zielorgan oder als Infusion über einen speziell platzierten intravasal liegenden Katheter. Als Implantationsorte wurden getestet: die Leber (z.B. Matas et al. 1975; 1976; Groth et al. 1977; Sutherland et al. 1977a; 1977b; Wilson et al. 1990; Chowdhury et al. 1991; Overtuf et al. 1996; Oren et al. 1999; Stefan et al. 1999; Sierra et al. 2000; Guha et al. 2002), die Milz (z.B. Mito et al. 1979; Henne-Bruns et al. 1989; Ribeiro et al. 1992; Vogels et al. 1996; Benedetti et al. 1997; Ikebukuro et al. 1999; Dunn et al. 2000; Ambrosino et al. 2001; Cai et al. 2002; Spinelli et al. 2002; Nagata et al. 2003), die Lunge (Selden et al. 1984; Then et al. 1991; Sandbichler et al. 1994), das Intestinum (Berishvili et al. 2003), das Peritoneum oder das Omentum majus (z.B. Henne-Bruns et al. 1990; Wiederkehr et al. 1990; Ambrosino et al. 2001; Umehara et al. 2001; Hamazaki et al. 2002; Berishvili et al. 2003), die Niere (Xiangdong et al. 1991; Arkadopoulos et al. 1994; Fujikura et al. 1994), das Pankreas (Jaffé et al. 1988; Vroemen et al. 1988; Xiangdong et al. 1991), Speicheldrüsen oder Thymus (Fujikura et al. 1994) oder das subcutane Fettgewebe des Nackens oder der Axilla (Jirtle et al. 1980; Jirtle und Michalopoulos 1982; Hiraoka et al. 1983; Gupta et al. 1994). Meist wurde jedoch

die Milz bevorzugt, da sich diese als das am besten für die Leberzelltransplantation geeignete Organ heraus gestellt hatte. So sind hier die Leberzelltransplantate noch nach über einem Jahr nachweisbar und die transplantierten Hepatozyten bilden sogar einen leberähnlichen Aufbau mit läppchenartiger Struktur (Mito et al. 1979; Kusano und Mito 1982; Cuervas-Mons et al. 1985; Darby et al. 1986; Ebata et al. 1988; Maganto et al. 1990b; Racine et al. 1994; Racine-Samson et al. 1996; Ikebukuro et al. 1999; Matsusaka et al. 2000). Bei den meisten anderen Empfängerorganen beherrschten oft schon nach kurzer Zeit Nekrosen und Vernarbungen das histologische Bild. Selbst bei Transplantationen in die Leber kam es häufig zu Komplikationen, wie Herzstillstand, Portalvenenthrombose und portaler Hypertension sowie zu Leberinfarkten und -nekrosen (Groth et al. 1977; Mehigan et al. 1980; Walsh et al. 1982; Fuller 1988; Benedetti et al. 1997).

Die Transplantation von Leberzellen in Fremdorgane wie die Milz diente als Grundlage für mehrere tierexperimentelle Studien zum Ersatz der Leberfunktion bei akutem Leberversagen. Dieses weist eine extrem hohe Sterblichkeitsrate, ursachenabhängig von 60-95% auf. Bisher konnte eine Therapie nur unzureichend in Form von Kreuzzirkulation, Austauschtransfusionen, Plasmapherese, Hämo-perfusion, Dialyse über RP6-Membranen oder unter Verwendung von Leber-Zellkulturen enthaltenden Bioreaktoren erfolgen, mit nur entmutigenden Ergebnissen. Obwohl die allogene Lebertransplantation einen kompletten metabolischen Ersatz darstellt, bringt sie im Fall eines akuten (toxischen) Leberversagens aufgrund extrem hoher Morbidität und Mortalität (wegen des ausgedehnten und risikoreichen chirurgischen Eingriffs bei schlechtem Patientenallgemeinzustand) keinen Vorteil.

Die eindrucksvolle Fähigkeit der Leber zur Regeneration auch bei schwerer Schädigung ist gut bekannt – nachgewiesen an Organen von Überlebenden eines toxischen Leberversagens oder nach ausgedehnten Leberresektionen (Pack et al. 1962; Rozga 2002). Daraus folgerte man, dass das Hauptziel der Behandlung eines schweren Leberversagens im Schutz des Lebens durch Leberfunktionsersatz während der Phase der maximalen Leberinsuffizienz besteht, so dass die erkrankte Leber in dieser Zeit suffizient vertreten wird und sich währenddessen endogen regenerieren kann (Mito und Kusano 1993; Bernd et al. 1995; Markus et al. 1995; Strom et al. 1997a; 1997b; 1999; Runge et al. 2000).

In zahlreichen Tierversuchen konnte belegt werden, dass eine Leberzelltransplantation in Fremdorgane, wie beispielsweise die Milz, bei den unterschiedlichsten Ursachen des akuten Leberversagens effektiv ist. So konnten Sommer et al. (1979a) eine erfolgreiche Behandlung mit Hepatozytentransplantaten bei einem akuten ischämischen Leberversagen nach Ligatur der Portalvene und der *A. hepatica* an Hunden zeigen. Ähnlich Ergebnisse fanden sich auch

bei Ratten (Makowka et al. 1980). Auch die Überlebensrate nach einem durch D-Glaktosamin- oder N-Dimethylnitrosamin-Gabe ausgelösten toxischen akuten Leberversagen konnte bei Ratten oder Kaninchen durch eine Transplantation von Hepatozyten z.B. in die Milz oder in das Peritoneum deutlich gesteigert werden (Sommer et al. 1979b; Makowka et al. 1980; Baumgartner et al. 1983; Arkadopoulos et al. 1994; Habibullah et al. 1995). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass neben syngenem auch allo- und gar xenogene Hepatozyten erfolgreich angewendet werden können (Makowka et al. 1980; Arkadopoulos et al. 1994; Habibullah et al. 1995). Ebenfalls deutlich verbessert wurde das Überleben der Tiere durch eine Leberzelltransplantation in Fremdorgane wie die Milz, die Lunge oder in das Peritoneum nach einer ausgedehnten Hepatektomie (Cuervas-Mons et al. 1984; Minato et al. 1984; Then et al. 1991; Vogels et al. 1996; Nakamura et al. 1997; Ambrosino et al. 2001).

Auch bei chronischen Lebererkrankungen, wie bei einer Leberzirrhose, die durch Tetrachlorkohlenstoff- (und Phenobarbital-)Exposition bzw. durch Thioacetamid-Gabe induziert worden war, konnte im Rattenmodell durch Transplantation von syngenem, allogenen oder xenogenen Hepatozyten in die Milz ein signifikant verlängertes Überleben sowie verbesserte Leberfunktionsparameter (Ammoniak, Albumin, PTT, Gesamtbilirubin) erzielt werden (Eroles et al. 1986; Stefan et al. 1999; Kobayashi et al. 2000). Bei Ratten mit einem portocavalen Shunt konnte nach Transplantation von Leberzellen in die Milz ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Serum-Leberwerte, aber auch der neurologischen Symptome nachgewiesen werden (Ribeiro et al. 1992).

Eine weitere Therapieoption fand man durch Versuche an sogenannten Gunn-Ratten (Mutanten der Wistar-Ratte). Diese Tiere besitzen einen genetischen Defekt, der bei homozygoten Genträgern zu einem Fehlen und bei heterozygoten Genträgern zu einem Mangel an Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase führt. Dies hat zur Folge, dass die Ratten nur gering oder gar nicht zur Ausscheidung von konjugiertem Bilirubin fähig und daher durch Ansammlung unkonjugierten Bilirubins chronisch ikterisch sind. Dieses Syndrom gleicht dem Crigler-Najjar-Syndrom beim Menschen. Mehreren Arbeitsgruppen gelang der tierexperimentelle Nachweis, dass durch intraportale, intramuskuläre, intrahepatische, intrasplenische oder subkutane Injektion von Hepatozyten oder auch von klonalen Hepatomzellen sinkende Serumbilirubinspiegel zu verzeichnen waren, was belegt, dass die Transplantate Bilirubin konjugierten und somit eine Teilfunktion der genetisch bedingt kranken Rattenleber übernahmen (Matas et al. 1975; 1976; Groth et al. 1977; Sutherland et al. 1977b; Woods et al. 1982; Vroemen et al. 1986; Demetriou et al. 1991; Borel-Rinkes et al.

1992; Asonuma et al. 1992; Holzman et al. 1993; Kokudo et al. 1995; Genin et al. 1999; Guha et al. 2002; Kim et al. 2002).

Auch an analbuminämischen Nagase-Ratten konnte der Erfolg der heterotopen Leberzelltransplantation nachgewiesen werden. Diese Tiere besitzen aufgrund eines genetischen Defekts keine eigene Albuminsynthese. Nach Transplantation von allogenen isolierten Leberzellen ohne Gendefekt in die Milz, das Peritoneum oder die Leber konnte in den Empfängertieren eine über mehrere Monate andauernde Albuminproduktion beobachtet werden (Holzman et al. 1993; Rozga et al. 1995; Ikebukuro et al. 1999; Oren et al. 1999; Sierra et al. 2000; David et al. 2001).

Eine weitere Erkrankung, für die die Leberzelltransplantation eine Therapieoption darstellen könnte, ist die familiäre Hypercholesterinämie. Individuen mit dieser genetischen Störung besitzen entweder defekte LDL-Rezeptoren oder sie exprimieren diese unzureichend. Die fehlende LDL-Rezeptor-Funktion verursacht dauerhaft hohe Cholesterinspiegel, die zu einer frühzeitigen Atherosklerose mit z.B. koronarer Herzkrankheit oder peripher arterieller Verschlusskrankheit führen. Wilson et al. konnten 1990 zeigen, dass bei Kaninchen mit LDL-Rezeptor-Defizienz, sogenannten Watanabe-Kaninchen, die Spiegel an Gesamtcholesterin nach Leberzelltransplantation von gesunden Spendertieren um 30-50% sanken. Auch die Gentherapie eröffnet neue Möglichkeiten im Rahmen der Leberzelltransplantation. Chowdhury et al. (1991) entnahmen den Watanabe-Kaninchen Leberzellen und nutzten anschließend einen Retrovirus um das intakte LDL-Rezeptor-Gen (wild-Typ-Gen) in die defekten Leberzellen dieser Kaninchen gentechnisch zu übertragen. Die so veränderten Leberzellen wurden später wieder in die Watanabe-Kaninchen eingebracht und führten dort zu einer Erhöhung der funktionstüchtigen LDL-Rezeptoren und zu einer Absenkung des Gesamtcholesterins um 30 bis 50%.

Bereits 1993 wurden in Japan erstmals erfolgreich autologe Hepatozyten beim Menschen transplantiert. Dort wurde bei insgesamt 10 Patienten mit Leberzirrhose das im Rahmen einer Segmentresektion gewonnene Lebergewebe zur Separation von Hepatozyten genutzt, die dann heterotop in die Milz injiziert wurden. In der Mehrzahl der Fälle führte dies bei den Patienten zu einer klinischen Besserung. Weiterhin ließ sich eine erfolgreiche Besiedlung der Milz durch die transplantierten Hepatozyten belegen (Mito und Kusano 1993).

Auch in den USA konnte 1998 durch eine Arbeitsgruppe um Fox bei einem 10-jährigen Kind mit einem Crigler-Najjar-Syndrom erfolgreich eine Leberzelltransplantation durchgeführt werden. Hierbei wurden allogene Leberzellen in die Pfortader infundiert. Im Verlauf 1 Jahres kam es nach Transplantation trotz geringerer Anwendung der Lichttherapie zu einer Senkung

der Konzentration des indirekten Bilirubins im Plasma um bis zu 50%. Die Aktivität der UDP-Glucuronosyltransferase stieg von vorher kaum messbaren 0,4% auf 5,5% der normalen Enzymaktivität (Fox et al. 1998).

Bei einem akuten Leberversagen wurden ebenfalls schon Leberzellen transplantiert. So berichteten Fisher et al. 2000 über den Fall einer 37-jährigen Frau, die an einem Leberversagen bei Drogenabusus und akuter Hepatitis B mit extrem hohen Leberwerten und einer Enzephalopathie Grad I litt. Hier wurden $8,8 \times 10^6$ Leberzellen intraportal infundiert. Die Leber erholte sich vollständig und die Patientin zeigte sich auch 10 Monate nach dem Eingriff klinisch regelrecht bezüglich der Leberfunktion. Interessanterweise konnte nach 4 Monaten die Immunsuppression ausgeschlichen werden, da sich keine Spenderzellen-DNA mehr nachweisen ließ.

Auch gentechnisch veränderte Leberzellen wurden bereits autolog transplantiert. So wurde 1995 durch Grossmann et al. bei 5 Patienten (7-41 Jahre alt) mit homozygoter hereditärer familiärer Hypercholesterinämie, bei denen wegen mangelnder LDL-Rezeptor-Funktion Cholesterinspiegel-senkende Medikamente oder eine Plasmapherese nur unzureichend wirksam waren, eine Leberteilresektion vorgenommen, daraus isolierte Hepatozyten gewonnen und anschließend mit einem Retrovirus behandelt, der ein Gen für einen funktionstüchtigen LDL-Rezeptor besaß. Danach wurden die Leberzellen mittels einer intraportalen Infusion den Patienten wieder zugeführt. Bei allen so behandelten Personen waren signifikant sinkende LDL- und Gesamtcholesterin-Spiegel nach Gentherapie und Transplantation zu verzeichnen, in einigen Fällen war der LDL-Katabolismus bis zu 53% erhöht.

Neben adulten Hepatozyten wurden auch bereits fetale Leberzellen transplantiert. So verabreichte eine indische Arbeitsgruppe um Habibullah 1994 fetale humane Leberzellen intraperitoneal bei 7 Patienten mit akutem Leberversagen. Auch hierbei fand sich ein deutlicher Überlebensvorteil bei den Transplantat-Empfängern im Vergleich zu unbehandelten Patienten.

Soriano et al. transplantierten 1997 bei 3 Kindern mit fulminantem Leberversagen aufgrund einer Medikamenten-Überdosierung Spender-Leberzellen, die zuvor kryokonserviert und kurz vor der Übertragung aufgetaut worden waren. Bei einem 15-jährigen Mädchen waren Parameter wie Ammoniakspiegel und Gerinnung nach der Transplantation deutlich gebessert, sie verstarb jedoch an den neurologischen Schäden. Ein 12-jähriger Junge mit Tuberkulose und Medikamentenreaktion wies verbesserte Ammoniakspiegel nach der 2. Leberzellinjektion auf, verstarb jedoch danach an Leberversagen. Im Fall eines 3-jährigen Mädchens mit

Leberversagen unbekannter Ätiologie und histologisch weniger als 10% lebender Leberzellen wurden 9 Leberzellinjektionen durchgeführt. Ihre Enzephalopathie und die Syntheseparameter der Leber normalisierten sich innerhalb von 2 Wochen. In der Leberbiopsie, die 9 Monate nach dem Eingriff durchgeführt wurde, stellte sich ihre eigene Leber wieder völlig regeneriert dar, so dass die Immunsuppression ausgeschlichen werden konnte. Auch Strom et al. transplantierten humane kryokonservierte Leberzellen bei insgesamt 7 Patienten mit fulminantem Leberversagen (viral- oder Medikamenten-induziert), hier mittels Injektion in die Milzarterie oder die Portalvene. Es konnte so bei Leberversagen verschiedener Genese eine 50%-ige Überlebensrate bis zur endgültigen Lebertransplantation erreicht werden, währenddessen in der Kontrollgruppe, die keine Leberzelltransplantation erhalten hatte, die Mortalität 100% betrug. Auch bei den Patienten mit genetisch bedingten Stoffwechselerkrankungen/ Enzymdefiziten (Ornitin-Transcarbamoylase-Mangel, Alpha-1-Antitrypsinmangel) konnte bei zuvor nicht messbaren Enzymaktivitäten im Anschluss an die Leberzelltransplantation eine deutliche Enzymaktivität ermittelt werden (Strom et al. 1997a; 1997b).

Trotz der bereits zahlreich durchgeführten Leberzelltransplantationen, nicht nur im Tiermodell, sondern auch beim Menschen, unter anderem auch in Fremdorgane wie die Milz, ist eine funktionelle Charakterisierung der ektop transplantierten Hepatozyten bislang nur in sehr geringem Umfang erfolgt. Diese Frage ist nicht ohne Bedeutung, denn nur wenn die Transplantate auch die lebertypischen Funktionen erfüllen, können sie eine Entlastung bzw. einen teilweisen Ersatz für dieses Organ bieten. Da die in ein Fremdorgan transplantierten Leberzellen einer ganz anderen nervalen und humoralen Kontrolle unterliegen als die Zellen in der Leber, müssen sie nicht notwendigerweise die gleichen Enzyme bzw. das gleiche Enzymmuster wie die orthotopen Hepatozyten exprimieren. Auch können sie in ihrer Funktion ganz anders reguliert sein als die entsprechenden Zellen in der Leber.

4. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung von in die Milz transplantierten fetalen Leberzellen im Vergleich zur Normalleber zu leisten. Dabei spielten folgende Überlegungen eine Rolle:

Heterotopie von Geweben bedeutet, dass normales Gewebe mit regelrechtem Aufbau an einem Ort auftritt, an dem es *per se* nicht im Organismus vorkommt. Im Zusammenhang mit der Transplantation von Lebergewebe in die Milz stellt sich nun die Frage, ob und in wie weit sich die veränderten Standortbedingungen und auch der damit verbundene Ausschluß von der portovenösen Blutzufuhr auf das Transplantat auswirken und somit zu funktionellen Unterschieden zwischen heterotopem und orthotopem Lebergewebe führen.

In vorangehenden Dissertationen wurde bereits untersucht, ob sich Leberzellen in der Milz ansiedeln lassen und im Fremdmilieu überleben. Durch histologische Begutachtung konnte N. Lucas (2003) beweisen, dass transplantierte syngene fetale Leberzellen in der Milz anwachsen, sich sogar vermehren, eine leberbälkchenartige Struktur bilden und eine immunhistochemisch nachweisbare CYP-Isoform-Expression ähnlich der Leber aufweisen. Sie konnte weiterhin zeigen, dass diese Expression durch typische Induktoren des CYP-Systems, wie β -Naphthoflavon oder Phenobarbital, gesteigert werden kann. In nachfolgenden Arbeiten von A. und T. Krauß (2003) konnte nachgewiesen werden, dass in den Transplantaten auch eine CYP-abhängige Monooxygenasefunktion vorhanden ist. Dadurch konnte belegt werden, dass die durch N. Lucas nachgewiesenen Enzyme auch eine Funktion aufweisen. Diese Funktion nahm mit der Zeit nach Transplantation kontinuierlich zu und war parallel zu den Untersuchungen von N. Lucas auch durch CYP-Induktoren steigerbar.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun versucht werden, den Einfluss auch anderer Substanzgruppen mit typischen Effekten auf die Lebern auf die Leberzelltransplantate zu untersuchen und somit die transplantierten Zellen weiter zu charakterisieren. Untersucht wurden hierbei:

1. Substanzen sowohl mit mitogenen als auch mit CYP-induzierenden Effekten auf die Leber (Fluoren, Fluorenol),
2. typische Leberzellgifte (Tetrachlorkohlenstoff, Brombenzol),
3. das Schwermetallsalz Cadmium-Sulfat.

Analysiert wurde vorrangig der Einfluss dieser Substanzen auf das CYP-System, wobei vor allem die Wirkungen auf die CYP-abhängige Monooxygenasefunktion interessierten. Hierzu

wurde biochemisch die Substanzwirkung auf die CYP-Familien 1, 2 und 3 untersucht, da diese für den Fremdstoffwechsel besonders bedeutend sind. Um die entsprechenden CYP-Isoformen genauer darzustellen, nutzten wir folgende Modellreaktionen (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; 2000):

- die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung zum Nachweis speziell der CYP-Isoformen 1A1 und 1A2,
- die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung zur Untersuchung der CYP-Familien 1A, 2A, 2B, 2C und 2E,
- die Ethylmorphin-N-Demethylierung zur Analyse vorwiegend der CYP3A-Isoformen.

Die oben genannten Substanzen wurden ausgewählt, da bei Ihnen bereits die typischen Effekte an der Leber bekannt sind (siehe Kapitel 3.4.) und wir uns so Rückschlüsse auf das Verhalten der transplantierten Hepatozyten erhoffen konnten.

Fluoren und Fluorenol sind als potente Mitogene für Rattenleberzellen, aber auch für andere Gewebe (z.B. Nebennierenrinde), bekannt (Danz et al. 1992; 1998). Weiterhin wurde für FEN eine Induktion der CYP-Familien 1A und 2B und für FEN und FON eine Zunahme der Aktivitäten bestimmter CYP-vermittelter Monooxygenase-Modellreaktionen, wie der Ethoxyresorufin- und Ethoxycoumarin-O-Deethylierung nachgewiesen (Aström et al. 1986; Ayrton et al. 1990; Danz et al. 1992; Chaloupka et al. 1995). Als zugrundeliegenden Mechanismus vermutet man eine Enzyminduktion über den Ah-Rezeptor.

Tetrachlorkohlenstoff wird zunächst zum Trichlormethylradikal „gegiftet“, wonach es durch seine toxische Wirkung entfalten kann. Da dieser Schritt streng CYP-abhängig und das Radikal sehr kurzlebig ist, eignet sich diese Substanz gut zur Beurteilung der Aktivität des CYP-Systems in den transplantierten Leberzellen.

Brombenzol wird zunächst CYP-abhängig in Bromphenol überführt. Durch weitere CYP-vermittelte biochemische Prozesse entstehen schließlich im Sinne einer Giftung zytotoxische Zwischenprodukte wie Quinone und 3,4-Epoxide. Da die Zwischenschritte CYP-abhängig sind, scheint auch Brombenzol zur Beurteilung der CYP-Aktivität in den Transplantaten geeignet.

Cadmiumsulfat wurde ausgewählt, da für dieses ebenfalls aus der Literatur eine Hemmung des CYP-Systems bekannt ist. Der Mechanismus dieser Hemmung ist bislang allerdings noch nicht exakt aufgeklärt.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Fischer-344-Inzucht-Ratten aus der institutseigenen Zucht. Die Tiere wurden bei einem 12h-hell/dunkel-Zyklus gehalten und erhielten Standardfutter Altromin 1316 und Trinkwasser *ad libitum*. Die für die Transplantation benötigten Spender-Feten wurden Muttertieren am 21. Trächtigkeitstag entnommen und die fetalen Lebern in Hank's Salzlösung (Verhältnis 1+1) mit einer Rasierklinge zu einer homogenen Suspension zerkleinert. Danach wurde den 60-90 Tage alten männlichen Empfängerratten 0,2 ml (entsprechend ca. $8,6 \times 10^6$ vitalen Zellen) dieser Suspension nach Laparotomie in die Milz injiziert. Kontrolltiere wurden nicht operiert. Immunsuppressiva wurden nicht verabreicht.

17 Wochen nach erfolgter Transplantation wurde den Versuchstieren (jeweils Transplantat-Empfängern und gleichaltrigen nicht transplantierten Kontrolltieren) je eine der folgenden Substanzen (Zellgift, Mitogen oder Schwermetall) oder das entsprechende Lösungsmittel verabreicht:

Fluoren wurde den Ratten einmalig intragastral in einer Dosis von 150 mg/kg Körpergewicht (KG), gelöst in 2,5 ml/kg KG Dimethylsulfoxid (DMSO), verabreicht. Die Organentnahme erfolgte 48 Stunden nach der Mitogenexposition in Äthernarkose.

Fluorenon wurde den Tieren ebenfalls intragastral verabreicht. Die Dosis betrug auch hier einmalig 150 mg/kg KG. Das Lösungsmittel war ebenfalls DMSO. Die Organentnahme erfolgte wie beim Fluoren 48 Stunden nach der Mitogenbehandlung in Äthernarkose.

Tetrachlorkohlenstoff erhielten die Versuchstiere 24 Stunden vor der Organentnahme in einer 1:10-Verdünnung in Maiskeimöl intraperitoneal verabreicht. Die Dosierung betrug 5 ml/kg KG.

Brombenzol wurde den Tieren einmalig in einer Dosis von 1,5 ml/kg KG in einer 1:4 Verdünnung mit Maiskeimöl intraperitoneal injiziert. Die Organentnahme erfolgte nach 24 Stunden in Äthernarkose.

Cadmium-Sulfat (CdSO_4) wurde den Ratten einmalig intraperitoneal in einer Dosis von 2 mg/kg KG, gelöst in 10ml/kg KG 0,9%-iger NaCl-Lösung verabreicht. Die Tötung der Tiere erfolgte 48 Stunden nach Injektion in Äthernarkose.

Alle mit Lösungsmittel behandelten Tiere (Kontrollen sowie Transplantat-Empfänger) erhielten zum gleichen Zeitpunkt statt der zu untersuchenden Substanzen nur deren Lösungsmittel. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte jeweils zur gleichen Uhrzeit, bei der auch die Substanzgabe erfolgt war (zwischen 8:00 Uhr und 9:00 Uhr morgens).

5.2. Materialgewinnung

Die Ratten wurden zunächst mit Ether getötet, anschließend dekapitiert und entblutet.

Die Lebern und Milzen wurden herauspräpariert und gewogen. Die im folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden mit ständig eisgekühltem Untersuchungsmaterial durchgeführt.

5.2.1. Herstellung des 9000g-Überstandes

Ein Teil Leber bzw. Milz wurde mit zwei Teilen 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 (Na-P-Puffer) mittels eines Potter-Elvehjem-Homogenisators (B. Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5403, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) 20 Minuten bei 9000g und 4°C zentrifugiert (Matsubara et al. 1976). Für die Untersuchung der Lebern wurden jeweils ca. 1,3 g des Organs eingewogen, bei den Milzen erfolgte größenbedingt die Verwendung des gesamten Organs. Der Überstand wurde anschließend sofort zur Bestimmung des Proteingehaltes und zur Durchführung der Modellreaktionen weiterverarbeitet.

5.2.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der 9000g-Überstände wurde die durch Klinger und Müller (1974) modifizierte Biuret-Methode angewandt. Das Prinzip dieser Methode ist, dass sich im alkalischen pH-Bereich Proteine und Kupfer-Ionen zu blau-violett gefärbten Komplexen verbinden. Die Intensität dieser blau-violetten Färbung ist meßbar und proportional zur Proteinkonzentration des 9000g-Überstandes.

Für den Probenwert wurde 0,25 ml 9000g-Überstand (1:4 mit Na-P-Puffer verdünnt) mit 0,25 ml 5%iger Natrium-Desoxycholatlösung versetzt. Nach 5 min wurden 4,5 ml Biuret-Reaktionslösung (1,5 g CuSO₄, 6,0 g KNaC₄H₄O₆, 300 ml 10%ige NaOH-Lösung und aqua bidest. ad 1000 ml) zugegeben. Für jede Probe wurde ein auf gleiche Weise hergestellter

Ansatz zur Bestimmung der Trübung mitgeführt, der statt der Biuret-Reaktionslösung 4,5 ml 3%ige NaOH-Lösung enthielt. Bei der Bestimmung des Leerwertes wurde anstelle des 9000g-Überstandes 0,250 ml 0,1 M Na-P-Puffer zugesetzt. Nach 30 min wurden die Extinktionen der Proben- und Trübungsansätze gegen ihre Leerwerte am Spektralphotometer vom Typ Spekol 11 der Firma Carl Zeiss Jena (Deutschland) gemessen. Die Messung erfolgte bei 546 nm und einer Küvettschichtdicke von 1 cm. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Von der gemessenen Extinktion wurde die des Trübungswertes subtrahiert. Für die Bestimmung der Eichkurve wurde Rinderserumalbumin in ansteigenden Konzentrationen (von 2 mg/ml bis 20 mg/ml) eingesetzt.

Der Proteingehalt der 9000g-Überstände wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Protein [mg/ml]} = (\text{Ext.}_{\text{HW}} - \text{Ext.}_{\text{TR}}) \times F_{\text{EK}} \times F_{\text{V}}$$

Ext._{HW} = Extinktion des Probenwertes

Ext._{TR} = Extinktion des Trübungswertes

F_{EK} = Faktor der Eichkurve

F_{V} = Verdünnungsfaktor

5.3. Monooxygenase-Modellreaktionen

5.3.1. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

Die Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Aktivität wurde in Anlehnung an die Methode von Pohl und Fouts (1980) durchgeführt. Bei Anwesenheit von Sauerstoff, NADPH, MgCl_2 , und Glucose-6-Phosphat (G-6-P) entsteht durch die Deethylierung des Ethoxyresorufins Resorufin (Reso). Die Resorufinbildung weist vor allem die Existenz und Aktivität der CYP-Subfamilie 1A, insbesondere des Isoenzym 1A1 nach (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; 2000). Die quantitative Bestimmung erfolgte im Fluoreszenz-Spektralphotometer F 2000 der Firma Hitachi, Kyoto, Japan, bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 580 nm.

Vor Versuchsbeginn wurden zunächst je 0,1 ml in Methanol gelöstes Ethoxyresorufin (100 μM) in die Reagenzgläser pipettiert und anschließend das Lösungsmittel Methanol bei 90°C im Wasserbad verdampft.

Der Inkubationsansatz von je 0,5 ml enthielt weiterhin folgende Reagenzien:

0,1 ml	0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
0,1 ml	0,1 M MgCl ₂ , gelöst in aqua bidest.,
0,1 ml	25 mM G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer,
0,1 ml	9000g-Überstand (Leber mit 0,1 M Na-P-Puffer 1:10 verdünnt, Milz unverdünnt),
0,1 ml	2,5 mM NADPH, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer.

Die Reaktion wurde nach 2-minütiger Vorinkubation im 37°C warmen Wasserbad durch die Zugabe von NADPH gestartet. Anschließend wurden die Proben unter Schütteln inkubiert. Die Reaktionszeit betrug bei den Lebern 5, bei den Milzen 15 Minuten. Die Inkubation wurde mit 1,0 ml eisgekühltem Methanol gestoppt und die Proben sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße 10 min bei 5000g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Firma Heraeus, Hanau, Deutschland) und der klare Überstand fluorimetrisch gemessen. Die mitgeführten Leerwerte enthielten die gleichen Substanzen, wurden allerdings nicht mitinkubiert und vor der NADPH-Zugabe mit kaltem Methanol gestoppt. Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Resorufin-Eichkurve erstellt. Dazu erfolgte, nach dem Verdampfen der Resorufinlösung (Endkonzentrationen 0, 1, 2, 4, 8 µM) die Zugabe von 0,5 ml 0,1 M Na-P-Puffer und 1,0 ml Methanol. Kofaktoren wurden nicht zugesetzt.

Die Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$A_{\text{Reso}} = \frac{\Delta I \times F_{\text{EK}} \times F_{\text{V}}}{\text{Prot.} \times t}$$

A_{Reso} = Enzymaktivität [nmol Resorufin x g Protein⁻¹ x min⁻¹]

ΔI = Differenz der Emmissionsintensitäten von Haupt- und Leerwert

F_{EK} = Faktor der Eichkurve

F_{V} = Verdünnungsfaktor

Prot. = Proteingehalt des 9000g-Überstandes

t = Inkubationszeit

5.3.2. Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

Die Messung der ECOD im 9000g-Überstand beruht auf dem Prinzip einer CYP-abhängigen C-Hydroxylierung an der Ethylgruppe von 7-Ethoxycoumarin (7-EC). Anschließend erfolgt die nichtenzymatische Abspaltung von Acetaldehyd, sodaß 7-Hydroxycoumarin (7-OH-C)

entsteht (Aitio 1978). Dieses wird im alkalischen Medium fluorimetrisch bestimmt und gilt als Maß für die Monooxygenaseaktivität von CYP, hauptsächlich der Subfamilien CYP 1A, 2A, 2B, 2C und 2E.

Die Reaktionsgleichung lautet:



Der Inkubationsansatz enthielt folgende Reagenzien:

0,1 ml	400 µM 7-EC; das Lösungsmittel Methanol wurde bei 90°C im Wasserbad verdampft,
0,1 ml	2,5 mM NADPH, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer,
0,1 ml	25 mM G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer,
0,1 ml	0,1 M MgCl ₂ , gelöst in aqua bidest.,
0,1 ml	0,1 M Na-P-Puffer (zum Volumenausgleich),
0,1 ml	9000g-Überstand (Leber mit 0,1 M Na-P-Puffer 1:10 verdünnt; Milz unverdünnt).

Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe der NADPH-Lösung im Schüttelwasserbad bei einer Wassertemperatur von 37°C. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Leberüberstände bzw. 20-minütigen Inkubation der Milzüberstände unter Schütteln wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml kalter 0,31 M Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Die Proben der Milzüberstände mußten im Anschluß hieran 10 min bei 5000g zentrifugiert werden (Megafuge 1.0, Firma Heraeus, Hanau, Deutschland). Danach wurde von den Milzproben 0,75 ml des Überstandes abgenommen und mit 3 ml kalter 0,05 N NaOH-Lösung versetzt und sofort im Anschluß das während der Inkubation entstandene 7-OH-C an einem Fluoreszenz-Spektralphotometer (F 2000, Firma Hitachi, Kyoto, Japan) bestimmt. Die Leberüberstände konnten aufgrund der geringeren Trübung direkt ohne vorherige Zentrifugation gemessen werden. Hierzu wurden die Proben mit 4 ml 0,05 N NaOH versetzt. Die Anregungswellenlänge betrug 375 nm, die Meßwellenlänge 454 nm. Die mitgeführten Leerwerte enthielten die gleichen Substanzen wie die Hauptwerte, wurden jedoch vor Zugabe des 9000g-Überstandes mit 0,5 ml kalter TCA gestoppt und nicht inkubiert. Zu jeder Versuchsreihe wurden Eichwerte mit 7-OH-C in verschiedenen Konzentrationen (0, 0,5, 1, 2, 4 mM) mitgeführt.

Die Enzymaktivitäten wurden wie folgt berechnet:

$$A_{7\text{-OH-C}} = \frac{\Delta I \times F_{\text{EK}} \times F_{\text{V}}}{\text{Prot.} \times t}$$

$A_{7\text{-OH-C}}$ = Enzymaktivität [$\text{nmol 7-OH-C} \times \text{g Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$]

ΔI = Differenz der Emmissionsintensitäten von Haupt- und Leerwert

F_{EK} = Faktor der Eichkurve

F_{V} = Verdünnungsfaktor

Prot. = Proteingehalt des 9000g-Überstandes

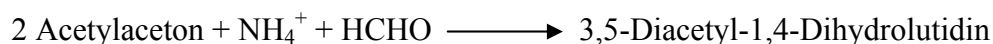
t = Inkubationszeit

5.3.3. Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND)

Das Prinzip der Ethylmorphin-N-Demethylierung im 9000g-Überstand beruht auf einer CYP-abhängigen C-Hydroxylierung an der N-Methylgruppe von Ethylmorphin und der anschließenden nichtenzymatischen Abspaltung von Formaldehyd (Klinger und Müller 1977; Kleeberg und Klinger 1982):



Dabei findet sich =N-CH_3 am Ethylmorphin. Das freigesetzte Formaldehyd gilt als Maß für die N-Demethylierung und somit auch für die Monooxygenaseaktivität von CYP, hauptsächlich der Subfamilie 3A (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; 2000). Es wird folgendermaßen nachgewiesen (Methode nach Nash 1953):



Der Inkubationsansatz von 1 ml enthält folgende Reagenzien:

0,50 ml	0,5 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
0,05 ml	6 mM NADP, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer,
0,05 ml	0,1 M G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer,
0,05 ml	0,1 M MgCl_2 , gelöst in aqua bidest.,
0,05 ml	0,2 M Semicarbacidhydrochlorid, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer,

0,20 ml 9000g-Überstand (Leber mit 0,1 M Na-P-Puffer 1:4 verdünnt; Milz unverdünnt),
 0,10 ml 6 mM Ethylmorphin, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer.

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Ethylmorphins. Nach 10-minütiger (Lebern), bzw. 30-minütiger (Milzen) Inkubation unter Schütteln bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 75%iger TCA gestoppt und anschließend 10 min bei 5000g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Firma Heraeus, Hanau, Deutschland). Danach wurden 0,5 ml des klaren Überstandes zur Formaldehydbestimmung nach Nash (Nash 1953), modifiziert nach Kleeberg und Klinger (Kleeberg und Klinger 1982), entnommen. Dieser wurde mit 0,5 ml Nash-Reagenz (30 g Ammoniumacetat, 0,4 ml Acetylaceton, 0,6 ml Eisessig und aqua bidest. ad 100 ml) versetzt und 40 min bei 37°C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Nach Abkühlung erfolgte die Extinktionsmessung an einem Spekol 11 der Firma Carl-Zeiss, Jena, Deutschland, bei einer Wellenlänge von 412 nm und einer Küvettenbreite von 0,5 cm.

Die Leerwerte erhielten statt Ethylmorphin 0,1 M Na-P-Puffer. Für jede Versuchsreihe wurden Eichwerte mit Formaldehyd (FA) in verschiedenen Konzentrationen (0, 0,25, 0,5, 1, 2 µM) anstelle von Ethylmorphin mitgeführt. Die Eich- und Leerwerte wurden nicht mit inkubiert und vor Zugabe des 9000g-Überstandes mit 75%iger TCA versetzt.

Die Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$A_{FA} = \frac{\Delta E \times F_{EK} \times F_V}{\text{Prot.} \times t}$$

A_{FA} = Enzymaktivität [$\mu\text{mol FA} \times \text{g Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$]
 ΔE = Extinktionsdifferenz zwischen Haupt- und Leerwert
 F_{EK} = Faktor der Eichkurve
 F_V = Verdünnungsfaktor
 Prot. = Proteingehalt des 9000g-Überstandes
 t = Inkubationszeit

5.4. Herkunft der verwendeten Substanzen und Lösungen

Zur Behandlung der Tiere verwendete Substanzen:

Cadmium-Sulfat, Fluoren: *Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*;

Brombenzol, Fluorenon, Tetrachorkohlenstoff: *Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz*;

Dimethylsulfoxid: *Merck, Darmstadt, Deutschland*.

Herkunft der Chemikalien für die biochemischen Untersuchungen:

Ethylmorphinhydrochlorid, Formaldehyd: *Merck, Darmstadt, Deutschland*;

7-Ethoxycoumarin, 7-Ethoxyresorufin, Glucose-6-Phosphat, 7-Hydroxycoumarin, NADPH,

7-Pentoxyresorufin, Resorufin: *Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*.

Alle anderen hier nicht speziell aufgeführten Chemikalien und Lösungen besaßen sämtlich den höchsten Reinheitsgrad und wurden von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

5.5. Auswertung, statistische Methoden und Darstellung der Ergebnisse

Sämtliche Versuche wurden mit jeweils 8 verschiedenen Rattenlebern bzw. -milzen ($n = 8$) durchgeführt. Die Meßwerte wurden in den graphischen Darstellungen als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Bei den Versuchen erfolgte innerhalb einer Versuchsserie die Prüfung auf signifikante Unterschiede zum einen zwischen den Rattenlebern und -milzen transplantierte Tiere und den entsprechenden Organen nicht-transplantierte Kontrolltiere und zum anderen zwischen den Organen der mit den verschiedenen Substanzen vorbehandelten Transplantatempfänger bzw. nicht-transplantierten Kontrolltiere und den Organen der mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelten Transplantatempfänger und nicht-transplantierten Kontrolltiere. Um die Signifikanz der Unterschiede zu berechnen, wurde der t-Test nach Student für unabhängige Stichproben angewandt, wobei Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant erachtet wurden. In den Graphiken sind signifikante Unterschiede mit einem Sternchen (bei signifikant unterschiedlichen Ergebnissen zwischen Substanz-Behandlung und Lösungsmittel-Gabe) bzw. Pluszeichen (bei signifikant unterschiedlichen Ergebnissen zwischen transplantierten und nicht-transplantierten Tieren) gekennzeichnet.

6. ERGEBNISSE

6.1. Behandlung mit Fluoren

In Abbildung 8 sind die relativen Organgewichte von Lebern und Milzen nicht transplantierter Kontrolltiere und transplantierter Ratten nach Vorbehandlung mit FEN bzw. dem Lösungsmittel DMSO dargestellt:

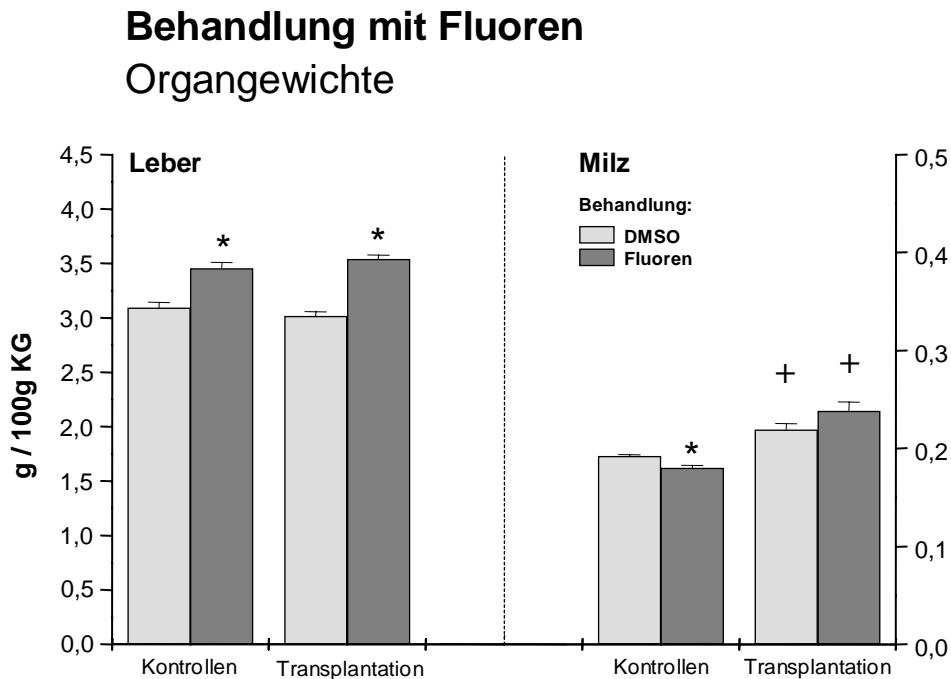


Abbildung 8: Organgewichte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluoren bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 10-14$; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Bei den Lebern sowohl der Kontrolltiere als auch der Transplantat-Empfänger zeigte sich nach FEN-Behandlung eine signifikante Zunahme der Organgewichte im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe um jeweils ca. 15%.

Bei den Milzen der Kontrolltiere fiel ein signifikanter Gewichtsverlust nach FEN-Verabreichung auf. Dagegen war das Gewicht der Transplantat-enthaltenden Milzen bei den Tieren, die FEN erhalten hatten, gegenüber denen, die DMSO verabreicht bekommen hatten, geringgradig, wenn auch nicht signifikant erhöht. Unabhängig von der Behandlung wiesen die Milzen der Transplantat-Empfänger gegenüber den Kontrollorganen signifikant höhere relative Organgewichte auf, während sich die Lebergewichte beider Tiergruppen unabhängig von der Behandlung nahezu glichen.

Abbildung 9 zeigt die Proteingehalte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit FEN bzw. DMSO:

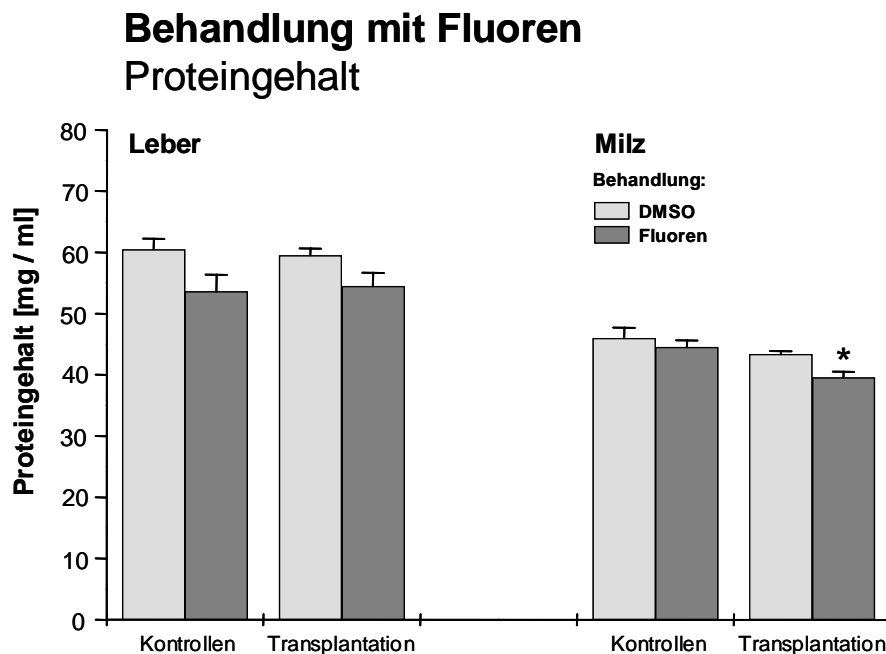


Abbildung 9: Proteingehalte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluoren bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung.

Die Grafik zeigt, dass die Milzen gegenüber den Lebern insgesamt einen geringeren Proteingehalt aufwiesen. Weiterhin fällt auf, dass die Lebern nicht transplanterter und transplanterter Tiere nach Behandlung mit FEN eine geringfügige Verminderung der Proteinkonzentration zeigten. Dieser war jedoch nicht signifikant. Bei den Milzen stellte sich bei den transplantierten Tieren sogar ein signifikanter Abfall der Werte um ca. 9% nach FEN-Gabe dar. Zwischen den Lebern und Milzen der Kontrolltiere und der Transplantat-Empfänger fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt.

In Abbildung 10 ist die EROD bei nicht transplantierten Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluoren bzw. DMSO zu sehen:

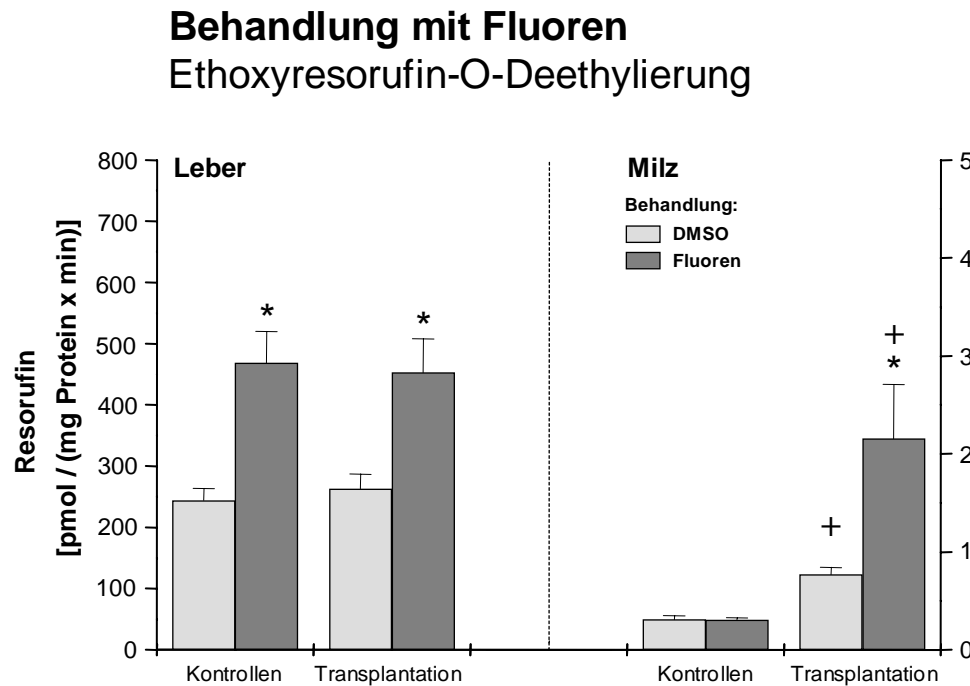


Abbildung 10: EROD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluoren bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Nach Behandlung mit FEN war eine Erhöhung der EROD-Aktivitäten in den Lebern sowohl von Kontrolltieren als auch von Transplantat-Empfängern um 90% bzw. 70% zu beobachten. Zwischen den Werten der beiden Tiergruppen fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Unabhängig von der Behandlung ließ sich in den Milzen der Kontrolltiere nur eine geringe Monooxygenaseaktivität nachweisen. Bereits nach Verabreichung von DMSO fanden sich in den Transplantat-enthaltenden Milzen signifikant höhere Umsätze als in den entsprechenden Kontrollorganen. Eine weitere Steigerung der Enzym-Aktivitäten war wie in den Lebern nach Behandlung mit FEN nachzuweisen, sie betrug ca. 180%.

Insgesamt lag jedoch das Niveau der EROD-Aktivitäten auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen deutlich unter dem der Lebern.

Abbildung 11 zeigt die ECOD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von nicht transplantierten und transplantierten Tieren nach Behandlung mit FEN bzw. DMSO:

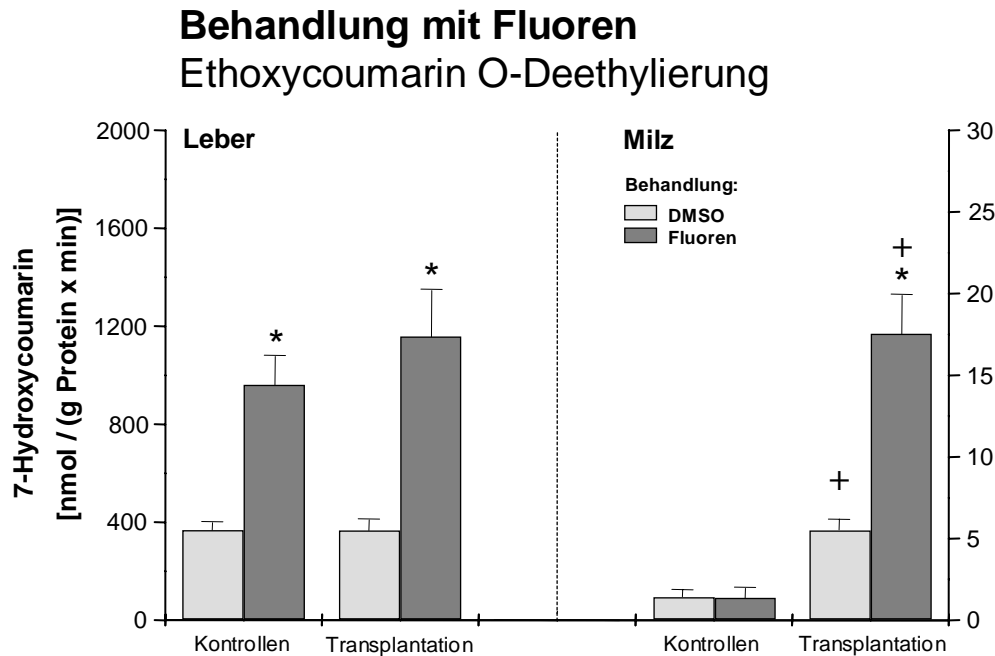


Abbildung 11: ECOD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluoren bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

In den Lebern von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern waren die ECOD-Aktivitäten nach Behandlung mit FEN im Vergleich zur DMSO-Gabe um 160% bzw. 213% signifikant erhöht. Zwischen den Lebern der Kontrolltiere und der transplantierten Ratten ergaben sich hingegen keine signifikant unterschiedlichen Werte. In den Milzen der Kontrolltiere ließ sich unabhängig von der Behandlung kaum eine Monooxygenase-Aktivität nachweisen, wohingegen im Vergleich hierzu in den entsprechenden Transplantat-enthaltenden Organen signifikant höhere Umsätze vorlagen. Die Aktivitäten in den Milzen der Transplantat-Empfänger konnten unter FEN-Behandlung deutlich um ca. 220% gesteigert werden. Die Höhe der Umsätze in den Milzen der Transplantat-Empfänger lag insgesamt bei ca. 1,5% der Werte der entsprechenden Lebern.

Die EMND bei nicht transplantierten und transplantierten Tieren nach Behandlung mit FEN bzw. DMSO ist in Abbildung 12 dargestellt:

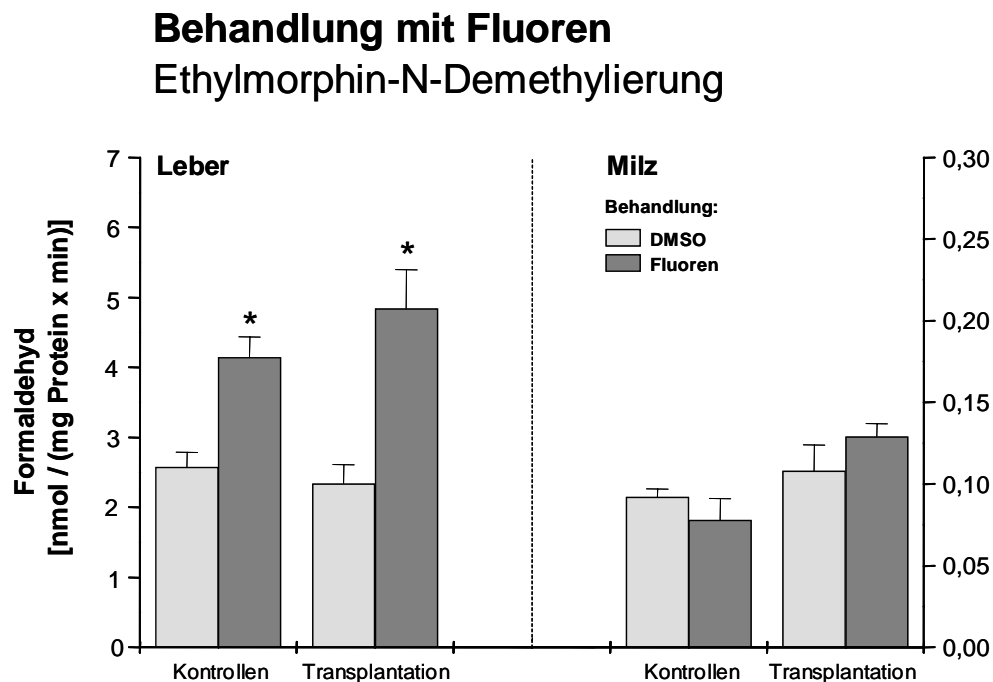


Abbildung 12: EMND-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluoren bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung.

Nach Behandlung mit FEN wiesen die Lebern von Kontrollratten und Transplantat-Empfängern im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe signifikant höhere EMND-Aktivitäten auf. Die Umsätze zeigten sich bei den Kontrollratten um 60% gesteigert, bei den Lebern der transplantierten Tieren nahmen die EMND-Aktivitäten sogar um 100% zu. Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Transplantat-Empfängern waren jedoch nicht signifikant.

In den Milzen der Kontrollratten und auch der transplantierten Tiere ließen sich nach Behandlung mit FEN keine signifikant unterschiedlichen EMND-Aktivitäten zur Lösungsmittel-Gabe nachweisen. Auch beim Vergleich der Ergebnisse der Milzen der Kontrollen und der Transplantat-Empfänger stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar. Die EMND-Aktivitäten der Milzen lagen insgesamt bei nur etwa 3% der Werte der Lebern.

6.2. Behandlung mit Fluorenon

In der Abbildung 13 sind die relativen Organgewichte von Lebern und Milzen nicht transplantierter Kontrolltiere und von Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit FON bzw. dem Lösungsmittel DMSO gezeigt:

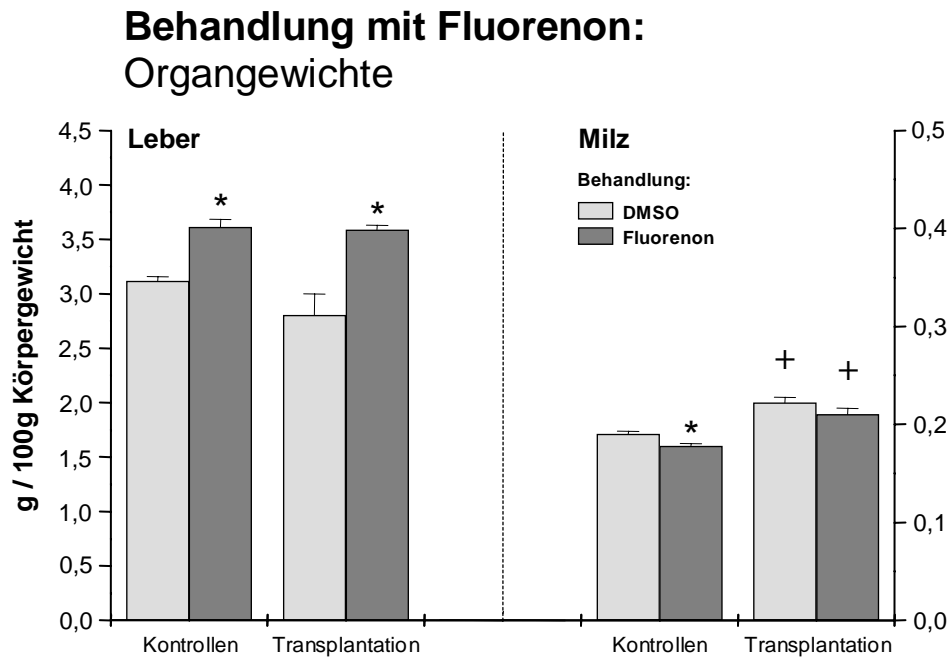


Abbildung 13: Organgewichte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluorenon bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 10-14$; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe fand sich eine signifikant erhöhte Lebermasse sowohl bei den mit FON behandelten Kontrollen als auch bei den transplantierten Tieren. Die Organgewichtssteigerung betrug hier 16% bei den Kontrolltieren bzw. 31% bei den Transplantatempfängern im Bezug auf die entsprechenden mit DMSO behandelten Tiere. Zwischen den Lebern von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei den Milzen der Kontrolltiere wurde dagegen nach FON-Verabreichung eine geringgradige, jedoch signifikante Abnahme des Gewichtes beobachtet. Das Gewicht der Transplantat-enhaltenden Milzen blieb unverändert. Insgesamt wiesen die Milzen der transplantierten Tiere im Vergleich zu den Milzen der Kontrolltiere signifikant höhere Organgewichte auf.

In Abbildung 14 sind die Proteingehalte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und von transplantierten Ratten nach Behandlung mit FON bzw. DMSO dargestellt:

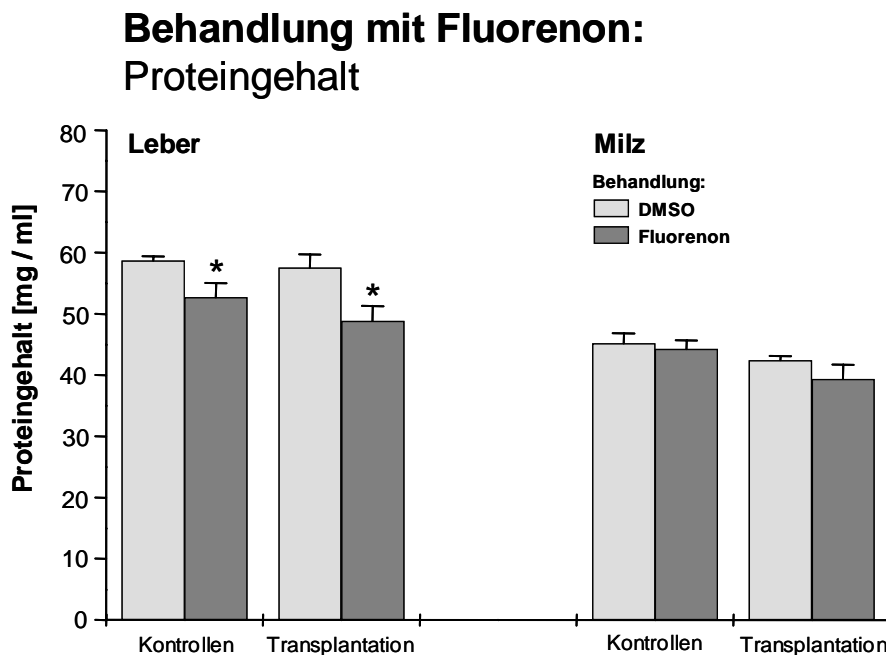


Abbildung 14: Proteingehalte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluorenol bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung.

Aus der Grafik ist zu ersehen, dass die Milzen wiederum gegenüber den Lebern einen geringeren Proteingehalt aufwiesen. Weiterhin fällt auf, dass die Lebern nicht transplanterter und transplanterter Tiere nach Behandlung mit FON einen signifikanten Abfall der Proteinkonzentration um 10% (Kontrolltiere) bzw. 15% (Transplantat-Empfänger) zeigten. Der Proteingehalt der Milzen war nach FON-Verabreichung vor allem bei den transplantierten Tieren vermindert, jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Behandlung mit DMSO. Zwischen den Kontrollen und den Transplantat-Empfängern zeigten sich keine Unterschiede in den Proteinkonzentrationen der Lebern und der Milzen.

Die EROD bei nicht transplantierten und transplantierten Ratten nach Behandlung mit FON bzw. DMSO ist in Abbildung 15 zu sehen:

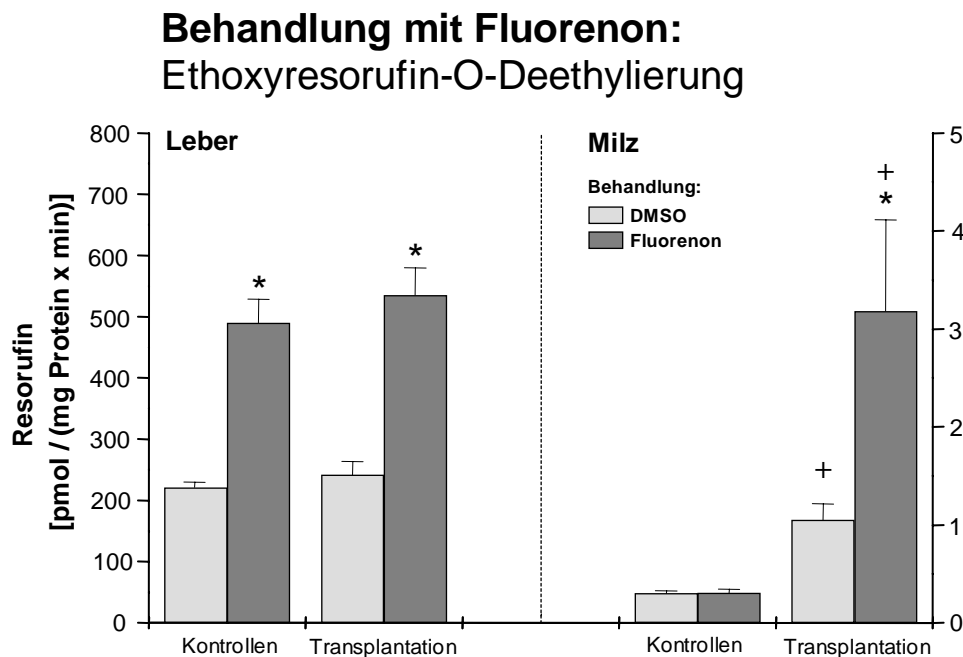


Abbildung 15: EROD-Aktivitäten in den Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluorenol bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Die Behandlung mit FON führte sowohl in den Lebern nicht-transplanterter Ratten als auch in den Organen transplanterter Tiere zu signifikant erhöhten EROD-Aktivitäten im Vergleich zur DMSO-Gabe. Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Transplantat-Empfängern war ein Anstieg der Werte um ca. 120% zu verzeichnen. Zwischen den beiden Tiergruppen bestanden keine Unterschiede.

In den Milzen der Kontrolltiere ließen sich unabhängig von der Behandlung nur geringe EROD-Aktivitäten nachweisen. Bei den Transplantat-Empfängern stellten sich im Vergleich hierzu hingegen signifikant höhere Umsätze dar. Wie in den Lebern wurde in den Transplantat-enthaltenden Milzen nach Behandlung mit FON eine Zunahme der EROD-Aktivitäten um etwa 200% verzeichnet.

Die Umsätze der Transplantat-enthaltenden Milzen lagen bei ca. 0,5 % der Werte der entsprechenden Lebern.

In Abbildung 16 ist die ECOD bei nicht transplantierten und transplantierten Ratten nach Behandlung mit FON bzw. DMSO dargestellt:

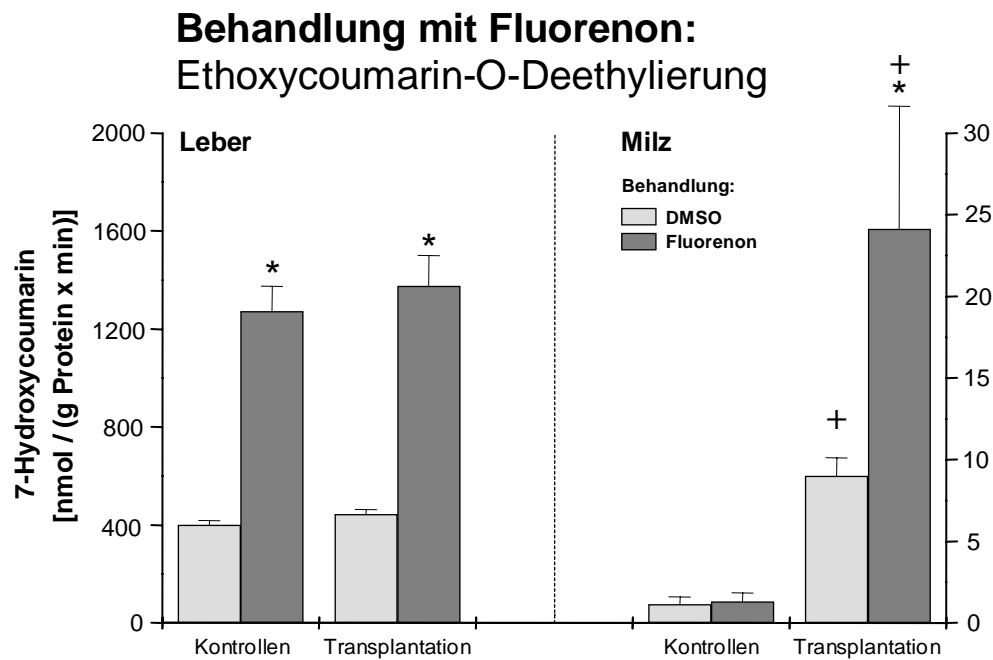


Abbildung 16: ECOD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluorenon bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

In den Lebern sowohl der Kontrolltiere als auch der Transplantat-Empfänger kam es nach FON-Verabreichung zu einer signifikanten Erhöhung der ECOD-Aktivitäten um ca. 210%. Im Quervergleich Kontrollen – transplantierte Tiere bestanden keine signifikanten Unterschiede.

In den Milzen der Kontrolltiere ließen sich unabhängig von der Behandlung kaum ECOD-Aktivitäten nachweisen, wohingegen bei den Transplantat-Empfängern insgesamt signifikant höhere Umsätze vorlagen. Die FON-Behandlung führte hier zu einer weiteren Steigerung der Enzym-Aktivitäten um 170%.

Die Umsätze in den Transplantat-enthaltenden Milzen lagen insgesamt bei ca. 2% der entsprechenden Werte in den Lebern. Das Ausmaß des Induktionseffektes nach FON-Gabe war in den Lebern und Milzen der Transplantat-Empfänger in etwa gleich: in den Lebern stiegen die Aktivitäten auf etwa das 3-fache ihres Ausgangswertes an, bei den Transplantat-enthaltenden Milzen auf etwa das 2,5-fache.

Abbildung 17 zeigt die EMND bei Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Verabreichung von FON bzw. DMSO:

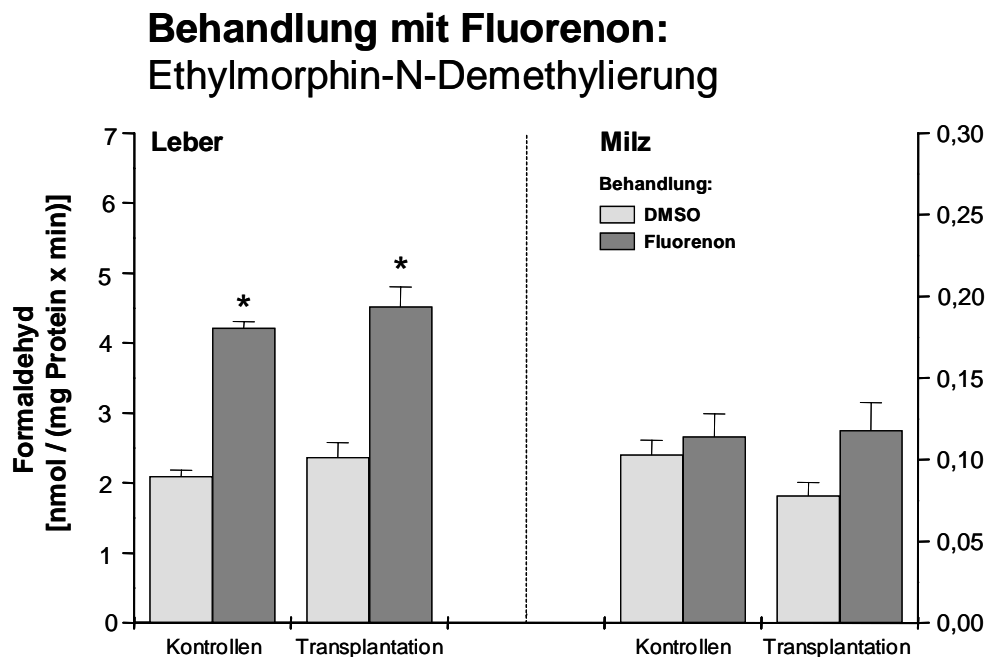


Abbildung 17: EMND-Aktivitäten in den Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Fluorenol bzw. DMSO (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus DMSO-Behandlung.

In den Lebern der Kontrollratten verdoppelten sich die EMND-Aktivitäten nach Behandlung mit FON im Vergleich zur DMSO-Gabe, in den Lebern der transplantierten Tieren erhöhten sich die Umsätze um ca. 90%. Zwischen den Werten der Kontrolltiere und der Transplantatempfänger bestanden keine Unterschiede.

Die Milzen vor allem der transplantierten Tiere ließen unter Behandlung mit FON eine leichte Steigerung der ENMD-Aktivitäten erkennen, diese war jedoch nicht signifikant. Keine Unterschiede fanden sich auch zwischen den Werten der Kontrolltiere und der Transplantatempfänger.

Insgesamt lagen die Umsätze in den Milzen bei ca. 4% der Aktivitäten der entsprechenden Lebern unter DMSO-Behandlung und bei ca. 2,5% nach FON-Gabe.

6.3. Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff

In der Abbildung 18 sind die relativen Orgengewichte von Lebern und Milzen nicht transplantierte Kontrolltiere und transplantierte Ratten nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. dem Lösungsmittel Maiskeimöl dargestellt:

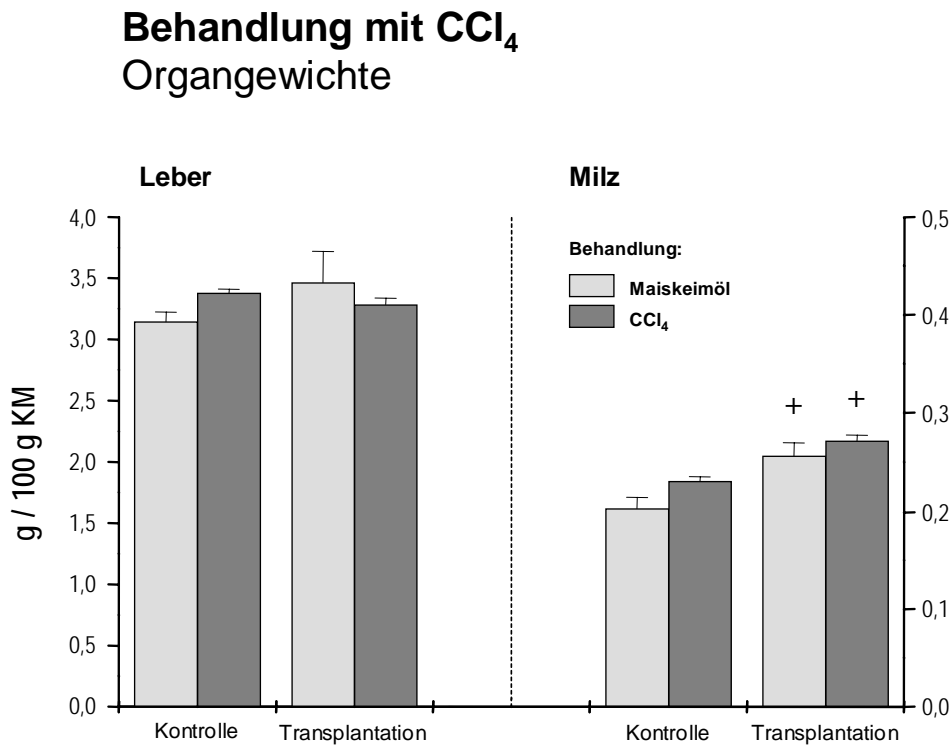


Abbildung 18: Organgewichte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Bei den relativen Orgengewichten von Lebern und Milzen fanden sich sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Transplantat-Empfängern nach der Gabe von CCl₄ keine signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden mit Lösungsmittel behandelten Ratten.

Die Transplantat-enthaltenden Milzen wiesen signifikant höhere relative Gewichte sowohl nach Gabe von CCl₄ als auch nach Maiskeimöl im Vergleich zu den Organen der nicht transplantierten Tiere auf. Dieser Unterschied betrug bei den Lösungsmittel-behandelten Tieren 17% und nach CCl₄-Gabe 15%.

Die Proteingehalte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Maiskeimöl sind in Abbildung 19 zu sehen:

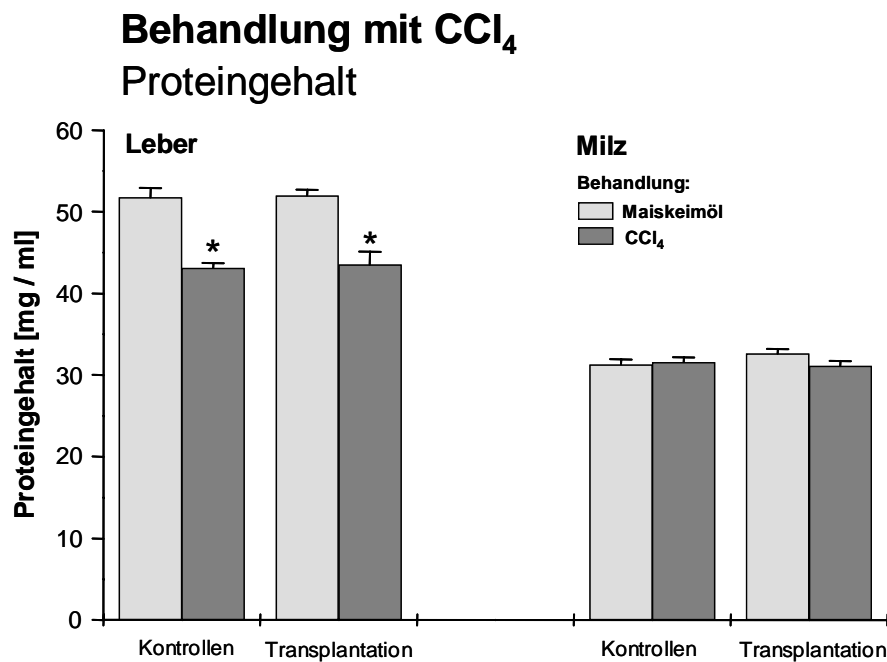


Abbildung 19: Proteingehalt der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung.

Auch in dieser Grafik zeigt sich ein geringerer Proteingehalt der Milzen gegenüber den Lebern. Weiterhin war bei beiden Tiergruppen nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff ein deutlicher Abfall in der Proteinkonzentration der Lebern um jeweils ca. 20% zu beobachten. Bei den Milzen war der Proteingehalt sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den transplantierten Ratten nach Tetrachlorkohlenstoff-Gabe nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Behandlung mit Maiskeimöl.

Zwischen Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern fanden sich weder bei den Lebern noch bei den Milzen klare Unterschiede.

Abbildung 20 stellt die EROD bei nicht transplantierten und transplantierten Tieren nach Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff bzw. Maiskeimöl dar:

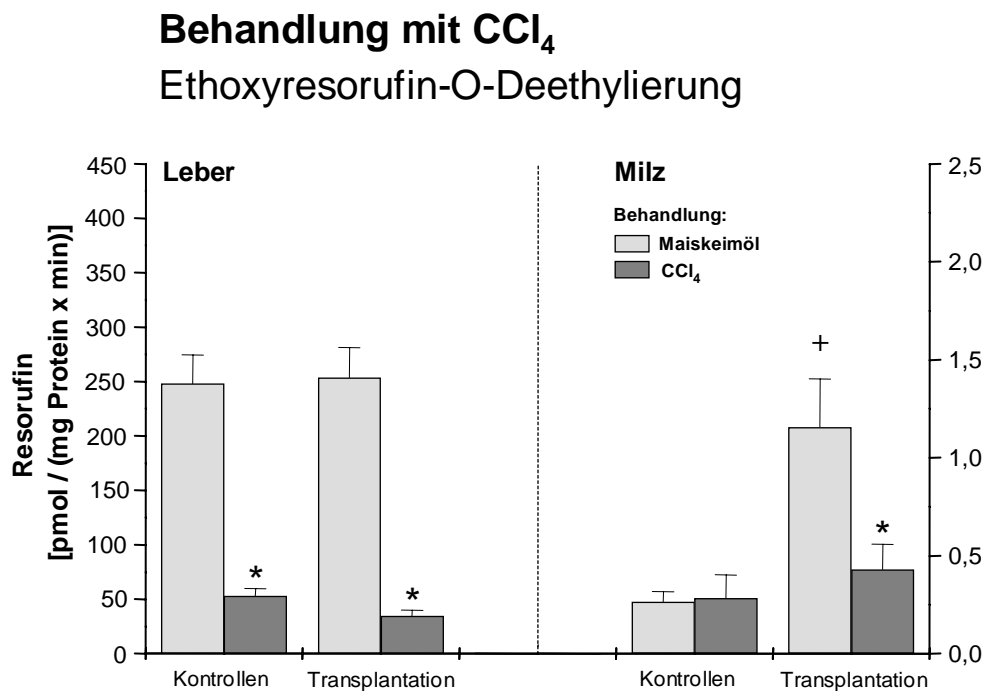


Abbildung 20: EROD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Bei der EROD fand sich nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff eine signifikante Abnahme der Umsätze um ca. 80% sowohl in den Lebern der nicht transplantierten als auch der transplantierten Ratten. In beiden Gruppen war dieses Verhalten in etwa gleich.

In den Milzen der Kontrolltiere ließ sich unter Behandlungen mit beiden Stoffen (Maiskeimöl und Tetrachlorkohlenstoff) nur eine geringe Aktivität der EROD nachweisen, signifikante Unterschiede bestanden hier nicht. In den Transplantat-enthaltenden Milzen stellten sich im Vergleich zu den Kontrollorganen sowohl nach Tetrachlorkohlenstoff- als auch nach Maiskeimöl-Gabe wesentlich höhere Umsätze dar. Im Falle der Lösungsmittelbehandlung war der Unterschied signifikant, die Werte der Transplantat-enthaltenden Milzen betrugen hier ca. 340% der entsprechenden Umsätze der Kontrollorgane.

In den Milzen der Transplantat-Empfänger fand sich wie in den Lebern nach Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff ein signifikanter Abfall der EROD-Aktivitäten um ca. 60% im Vergleich zur Behandlung mit Maiskeimöl.

Abbildung 21 zeigt die ECOD bei Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Maiskeimöl:

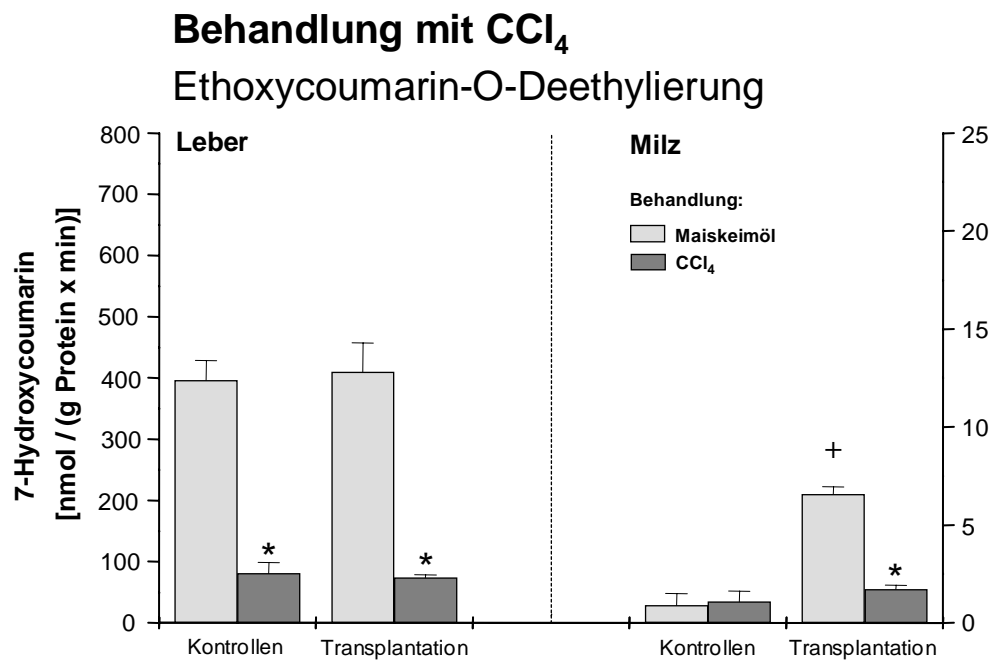


Abbildung 21: ECOD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Sowohl bei Kontrolltieren als auch bei den transplantierten Ratten sanken die ECOD-Umsätze nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff in den Lebern um ca. 80%. Zwischen Kontrollen und Transplantat-Empfängern fanden sich sowohl mit als auch ohne CCl₄-Behandlung keine deutlichen Unterschiede in den Werten der Lebern.

In den Milzen der Kontrolltiere ließ sich unabhängig von der Behandlung kaum eine Monooxygenaseaktivität nachweisen. Im Vergleich zu den Kontrollorganen zeigten sich in den Milzen der Lösungsmittel-behandelten Transplantat-Empfänger um das ca. 7-fache signifikant höhere Umsätze. Wie auch in den Lebern konnte in den Transplantat-enthaltenden Milzen nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff ein signifikanter Abfall der ECOD-Aktivitäten um ca. 74% verzeichnet werden.

Die Ergebnisse der EMND nach Tetrachlorkohlenstoff- bzw. Maiskeimöl-Behandlung bei Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern sind in Abbildung 22 dargestellt:

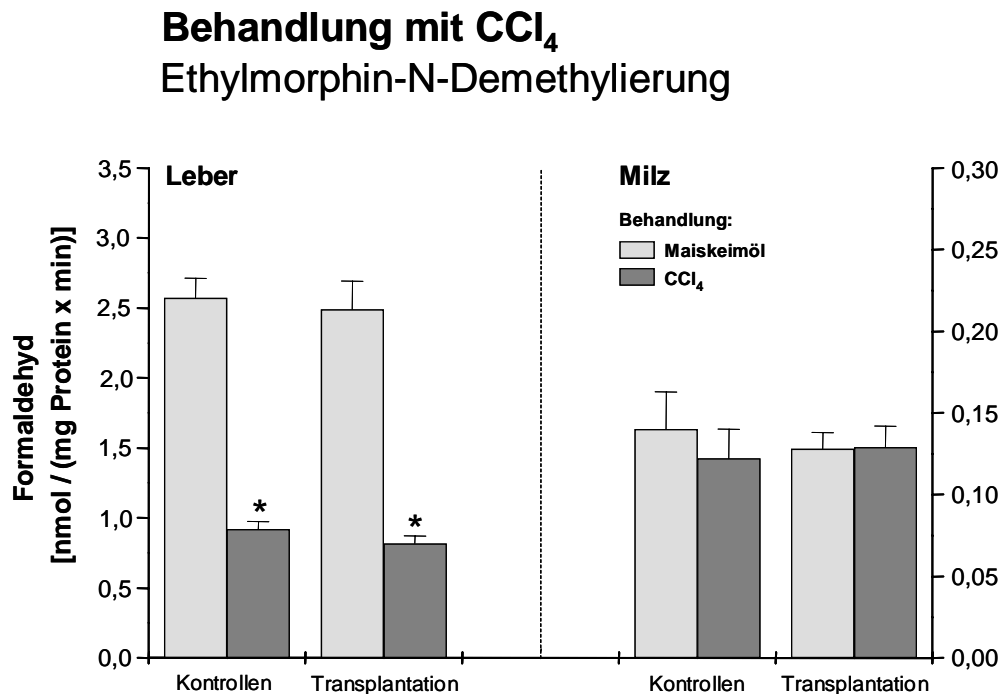


Abbildung 22: ENMD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung.

Die EMND-Aktivitäten sanken nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff in den Lebern der Kontrolltiere ebenso wie in denen der Transplantat-Empfänger signifikant um ca. 65%. Zwischen den Werten der Lebern der beiden Tiergruppen ließen sich jedoch keine Unterschiede nachweisen.

Bei den Milzen sowohl der Kontrollen als auch der transplantierten Tiere hatte die Behandlung keinen Einfluss auf die EMND. Auch zwischen den Organen der Kontrolltiere und der Transplantat-Empfänger zeigten sich keine Unterschiede. Nach Lösungsmittel-Gabe lagen die Werte in den Milzen bei ca. 6% der Aktivitäten der entsprechenden Lebern.

6.4. Behandlung mit Brombenzol

In Abbildung 23 sind die relativen Organgewichte von Lebern und Milzen nicht transplanterter Kontrolltiere und von Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit BBZ bzw. dem Lösungsmittel Maiskeimöl zu sehen:

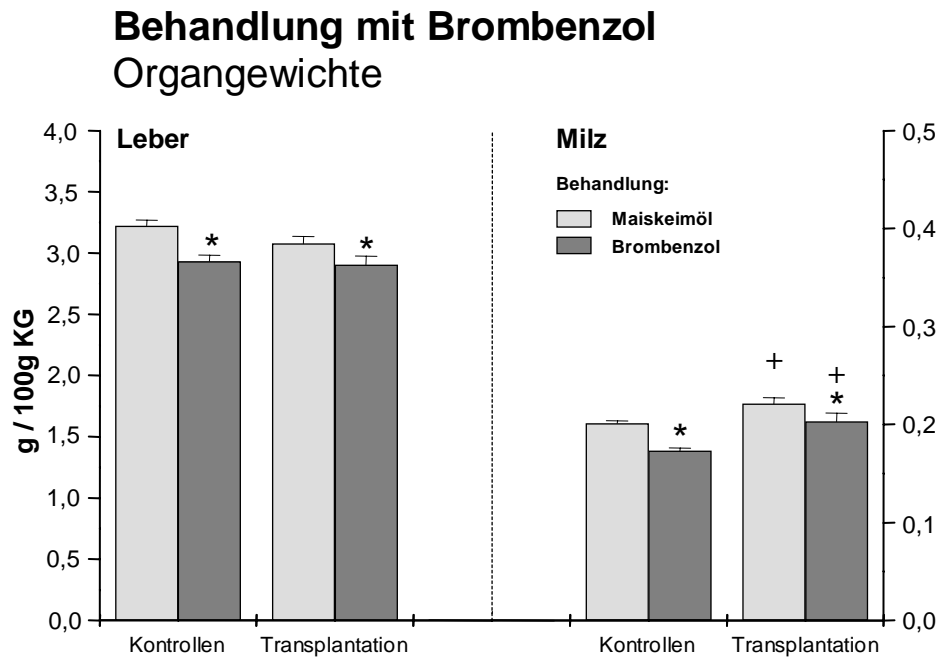


Abbildung 23: Organgewichte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Brombenzol bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 10-12$; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Die Lebern und Milzen der Kontrolltiere und der Transplantat-Empfänger zeigten nach Behandlung mit BBZ eine signifikante Verminderung der relativen Organgewichte.

Bei den Lebern betrug der Organgewichtsverlust ca. 15% bei den Kontrolltieren bzw. etwa 30% bei den Transplantat-Empfängern im Vergleich zu den entsprechenden mit Maiskeimöl behandelten Tieren. Das relative Gewicht der Lebern der Transplantat-Empfänger war unter beiden Behandlungen nicht signifikant von denen der nicht-transplantierten Kontrolltiere verschieden.

Bei den Milzen der Kontrollratten war ein Gewichtsabfall um 15%, bei den entsprechenden Organen der Transplantat-Empfänger um 8% nach BBZ-Behandlung im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe zu verzeichnen. Die relativen Organgewichte der Transplantat-enthaltenden Milzen waren sowohl nach BBZ- als auch nach Maiskeimöl-Verabreichung signifikant höher als die der entsprechenden Kontrollorgane.

Die folgende Abbildung zeigt den Proteingehalt der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und von Transplantat-Empfängern nach Gabe von BBZ bzw. Maiskeimöl:

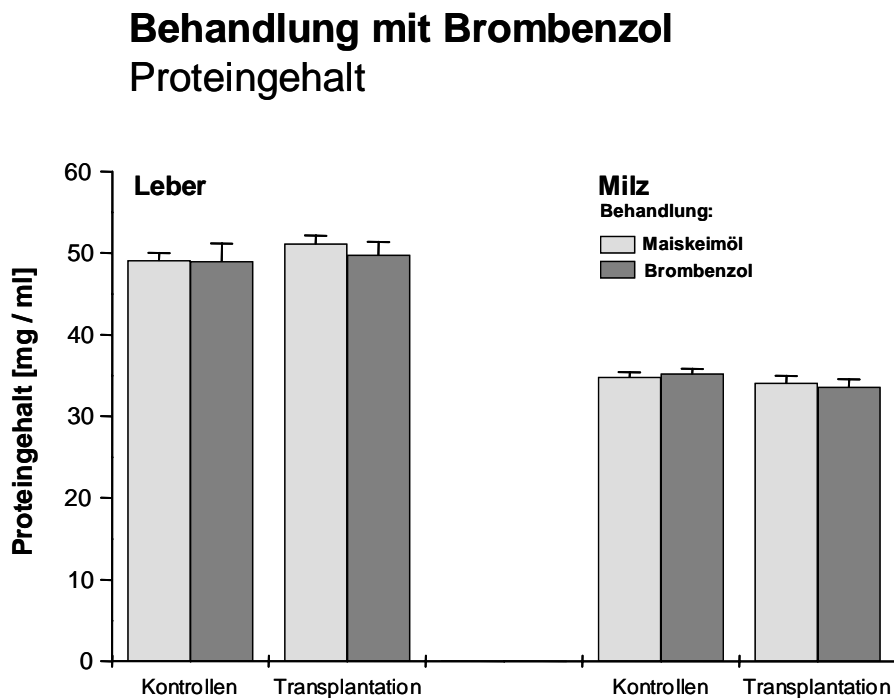


Abbildung 24: Proteingehalt der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Brombenzol bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung.

Auch hier zeigte sich in den Milzen ein insgesamt geringerer Proteingehalt als in den Lebern. Die Behandlung mit BBZ hatte keinen Einfluss auf die Proteingehalte der Lebern und Milzen sowohl der Kontrolltiere als auch der Transplantat-Empfänger. Auch zwischen den beiden Tiergruppen fanden sich weder bei den Lebern noch bei den Milzen signifikante Unterschiede.

In Abbildung 25 ist der Einfluss einer Behandlung mit BBZ bzw. Maiskeimöl auf die EROD bei nicht transplantierten und transplantierten Tieren dargestellt:

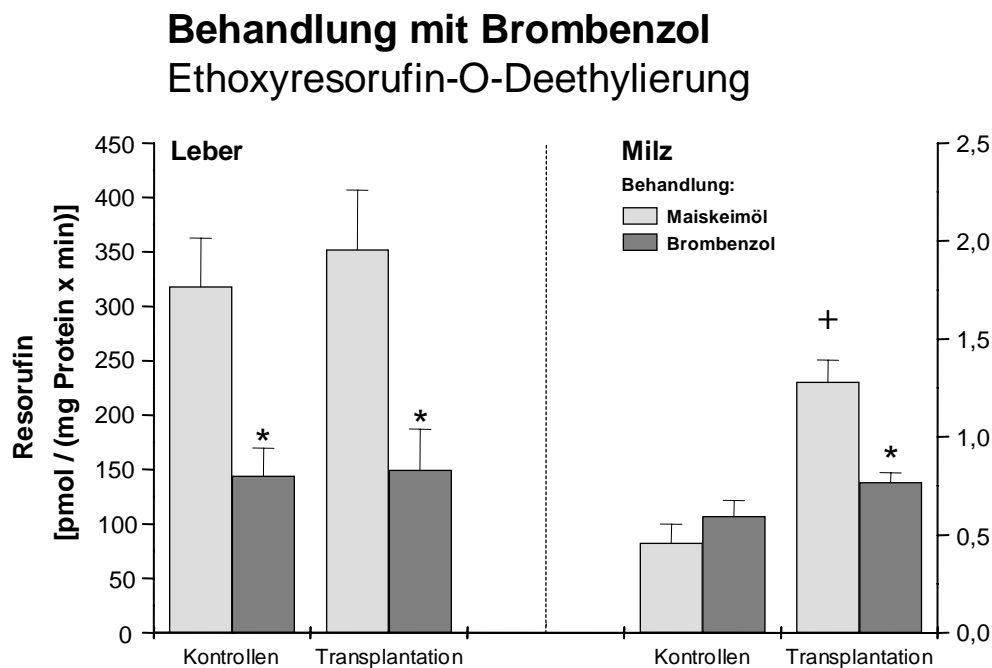


Abbildung 25: EROD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Brombenzol bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Nach Behandlung mit BBZ fand sich sowohl in den Lebern der nicht transplantierten als auch der transplantierten Ratten eine signifikante Abnahme der Umsätze um ca. 55%. In beiden Gruppen war dieser Effekt in etwa gleich.

Bei den Milzen der Kontrolltiere ließ sich unter Behandlung mit beiden Stoffen (Brombenzol oder Maiskeimöl) nur eine geringe Aktivität der EROD nachweisen, signifikante Unterschiede bestanden hier nicht. In den Transplantat-enthaltenden Milzen stellten sich sowohl nach Maiskeimöl- als auch nach BBZ-Verabreichung wesentlich höhere Umsätze im Vergleich zur Kontrollgruppe dar. Im Falle der Lösungsmittelbehandlung war dieser Unterschied sogar signifikant, er betrug hier ca. 165%.

In den Transplantat-enthaltenden Milzen fand sich weiterhin wie in den Lebern nach BBZ-Gabe ein signifikanter Abfall der EROD um ca. 40% im Vergleich zur Behandlung mit Maiskeimöl.

Abbildung 26 zeigt die ECOD bei nicht transplantierten und transplantierten Tieren nach Behandlung mit BBZ bzw. Maiskeimöl:

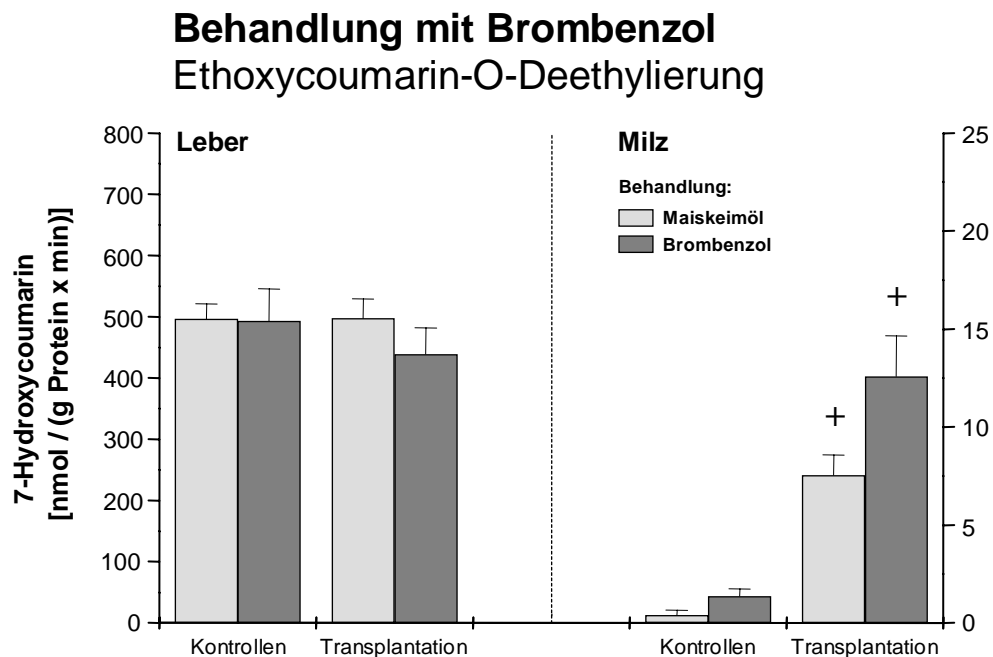


Abbildung 26: ECOD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Brombenzol bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung; +: $p \leq 0,05$ versus nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Die ECOD-Aktivitäten der Lebern waren weder bei den Kontrollratten noch bei den transplantierten Tieren nach Behandlung mit BBZ signifikant im Vergleich zur Maiskeimöl-Gabe verändert.

Bei den Milzen der Kontrolltiere ließ sich unabhängig von der Behandlung kaum eine Enzym-Aktivität nachweisen, wohingegen bei den Transplantat-enthaltenden Milzen signifikant höhere Umsätze (Zunahme um ca. 1430% nach Maiskeimöl-, um ca. 640% nach BBZ-Verabreichung) im Vergleich zu den Kontrollen vorlagen. Die Gabe von BBZ führte in den Transplantat-enthaltenden Milzen zu einer Steigerung der ECOD-Aktivitäten um ca. 40%. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Die Umsätze der Milzen betrugen insgesamt weniger als 3% der entsprechenden Werte der Lebern.

In Abbildung 27 ist die EMND bei Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit BBZ bzw. Maiskeimöl dargestellt:

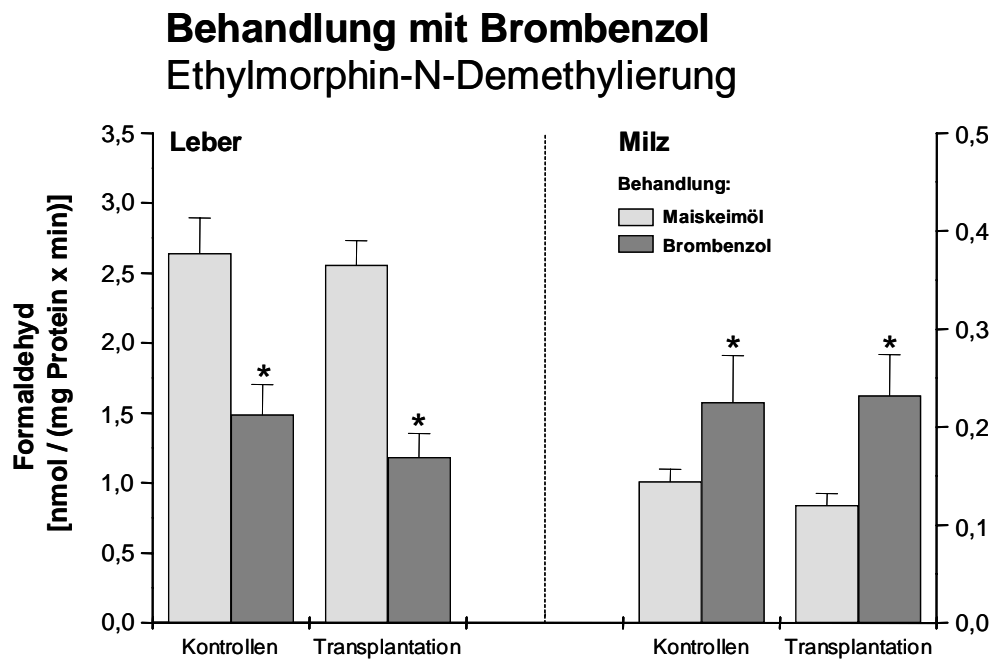


Abbildung 27: ENMD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Brombenzol bzw. Maiskeimöl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus Maiskeimöl-Behandlung.

Sowohl in den Lebern der Kontrolltiere als auch in denen der Transplantat-Empfänger sanken die EMND-Aktivitäten nach Behandlung mit BBZ signifikant im Vergleich zur Maiskeimöl-Gabe um ca. 40% bzw. 50%. Zwischen den beiden Tiergruppen fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Sowohl bei den Milzen der Kontrollratten als auch in denen der transplantierten Tiere ließ sich nach Behandlung mit BBZ eine signifikante Steigerung der ENMD-Aktivitäten im Vergleich zur Maiskeimölgabe nachweisen. Diese betrug bei den Kontrollen ca. 74% und bei den Transplantat-Empfängern ca. 110%. Beim Vergleich der Werte der nicht transplantierten und der transplantierten Tiere stellten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede dar.

Die ENMD-Aktivitäten in den Milzen lagen nach Lösungsmittel-Gabe bei ca. 5% der Werte der zugehörigen Lebern.

6.5. Behandlung mit Cadmium-Sulfat

Abbildung 28 zeigt den Einfluss einer Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. mit 0,9%iger NaCl (Lösungsmittel) auf die Organgewichte von Lebern und Milzen nicht transplantiert und transplantiert Ratten:

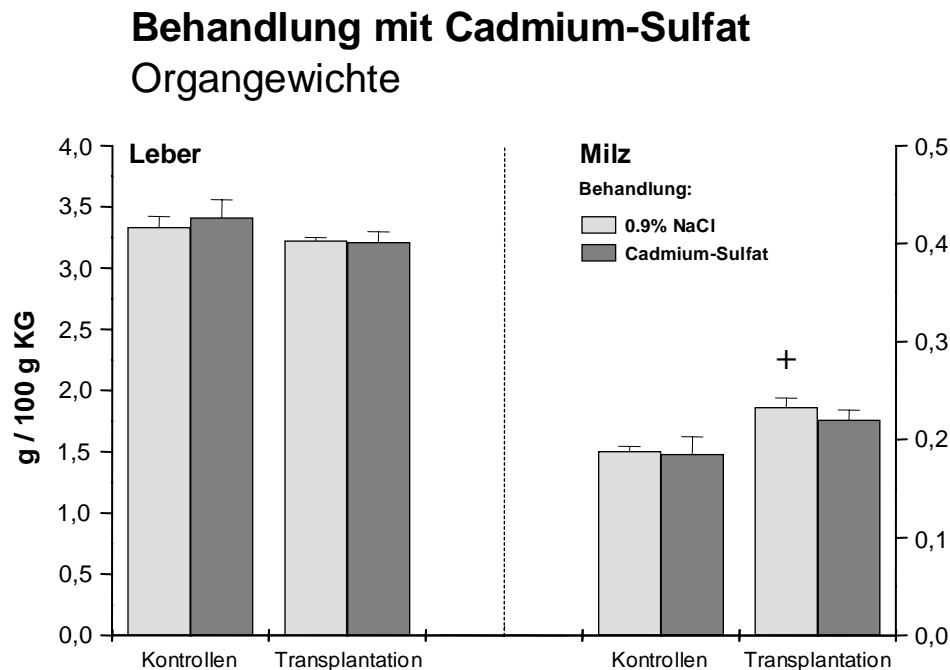


Abbildung 28: Organgewichte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. 0,9%iger NaCl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 6; *: $p \leq 0,05$ versus Behandlung mit 0,9%iger NaCl; +: $p \leq 0,05$ versus nicht transplantierte Kontrolltiere.

Die Behandlung mit Cadmium-Sulfat hatte keinen Einfluss auf die Leber- und Milzgewichte der Kontrolltiere und der Transplantat-Empfänger.

Ein Unterschied war jedoch beim Vergleich zwischen nicht transplantierten und transplantierten Tieren unter Lösungsmittel-Behandlung zu verzeichnen. Hier war das Gewicht der Transplantat-enthaltenden Milzen um ca. 15% höher als das der entsprechenden Kontrollorgane.

In der folgenden Abbildung sind die Proteingehalte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. mit 0,9%iger NaCl dargestellt:

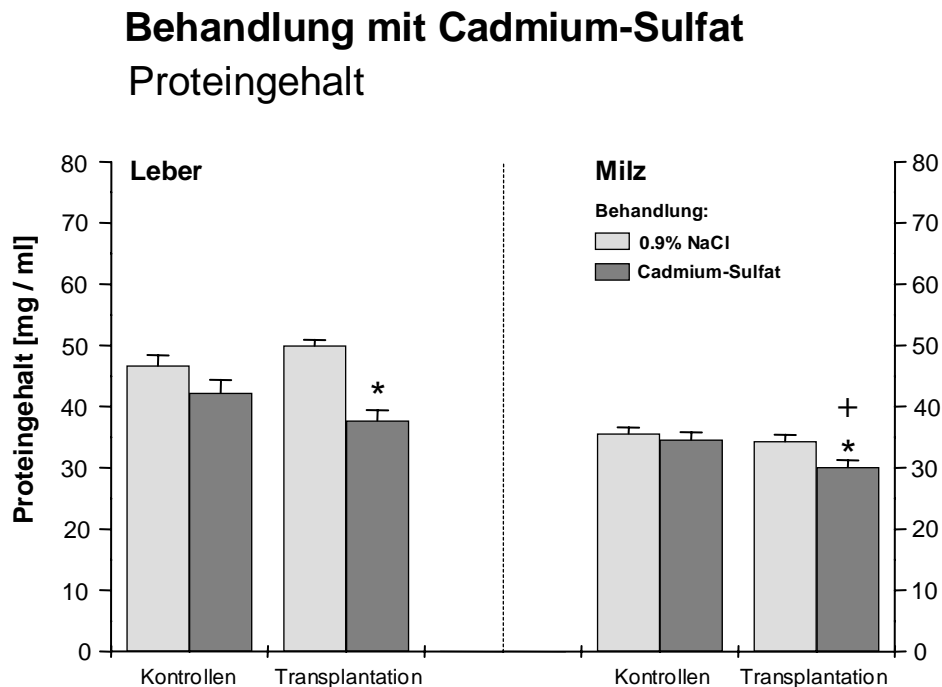


Abbildung 29: Proteingehalte der Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. 0,9%iger NaCl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus Behandlung mit 0,9%iger NaCl; +: $p \leq 0,05$ versus nicht transplantierte Kontrolltiere.

In den Lebern sowohl der nicht transplantierten als auch der transplantierten Ratten waren nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat im Vergleich zur NaCl-Gabe erniedrigte Proteinkonzentrationen zu verzeichnen. Dieser Effekt war jedoch nur bei den Transplantat-Empfängern signifikant und betrug hier ca. 25%. Auch bei den Milzen der transplantierten Tiere war nach Cadmium-Sulfat-Verabreichung ein signifikanter Abfall der Proteinkonzentration um ca. 15% zu verzeichnen. Bei den Lebern zeigten sich im Vergleich Kontrollen – Transplant-Empfänger keine Unterschiede. Nach Cadmium-Sulfat-Behandlung, nicht jedoch nach NaCl-Exposition, wiesen die transplantierten Milzen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen einen um ca. 20% signifikant niedrigeren Proteingehalt auf. Die Proteinkonzentration in den Milzen lag unter NaCl-Behandlung bei ca. 70% der Werte der Lebern.

Abbildung 30 zeigt die EROD bei nicht transplantierten und transplantierten Tieren nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. mit 0,9%iger NaCl:

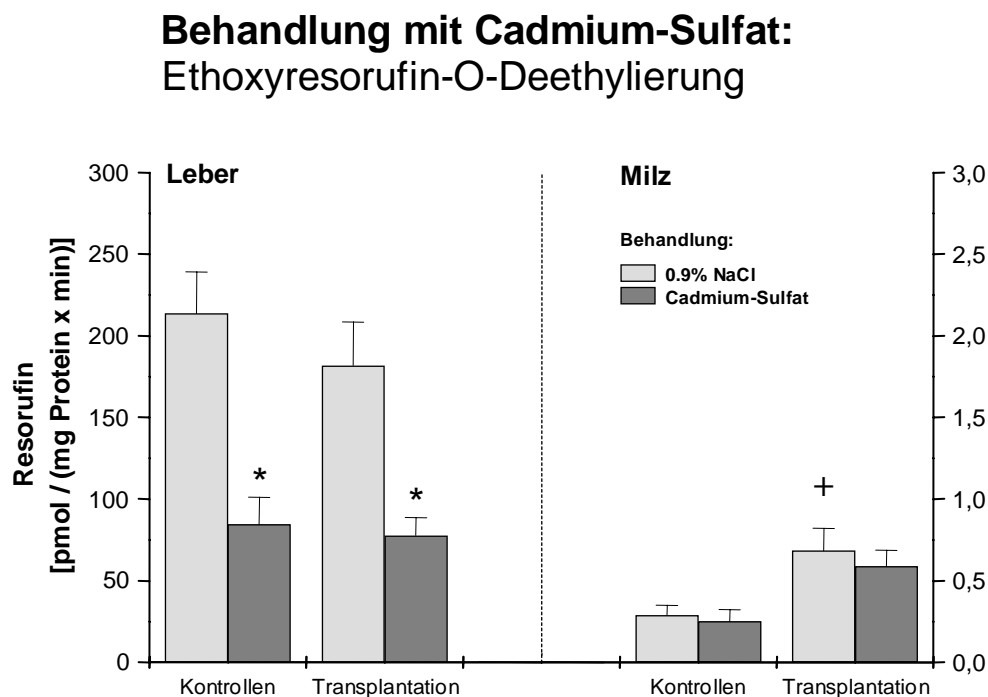


Abbildung 30: EROD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. 0,9%iger NaCl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 8; *: $p \leq 0,05$ versus Behandlung mit 0,9%iger NaCl; +: $p \leq 0,05$ versus nicht transplantierte Kontrolltiere.

Die Behandlung mit Cadmium-Sulfat führte im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe in den Lebern sowohl der nicht-transplantierten Ratten als auch der transplantierten Tiere zu signifikant verminderten EROD-Aktivitäten. Bei den Kontrollen zeigte sich eine Verminderung der Umsätze um ca. 70%, bei den Transplantat-Empfängern um ca. 65%. Zwischen den Werten der beiden Tiergruppen fanden sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede.

Auf die Aktivitäten in den Milzen der Kontrollen und auch der transplantierten Tiere hatte die Behandlung mit Cadmium-Sulfat keinen signifikanten Einfluss. Auch beim Vergleich der Ergebnisse der Milzen der Kontrollen und der Transplantat-Empfänger stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar.

In den Milzen lagen die EROD-Umsätze unter 1% der entsprechenden Werte der Lebern.

In Abbildung 31 ist die ECOD bei Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. 0,9%iger NaCl zu sehen:

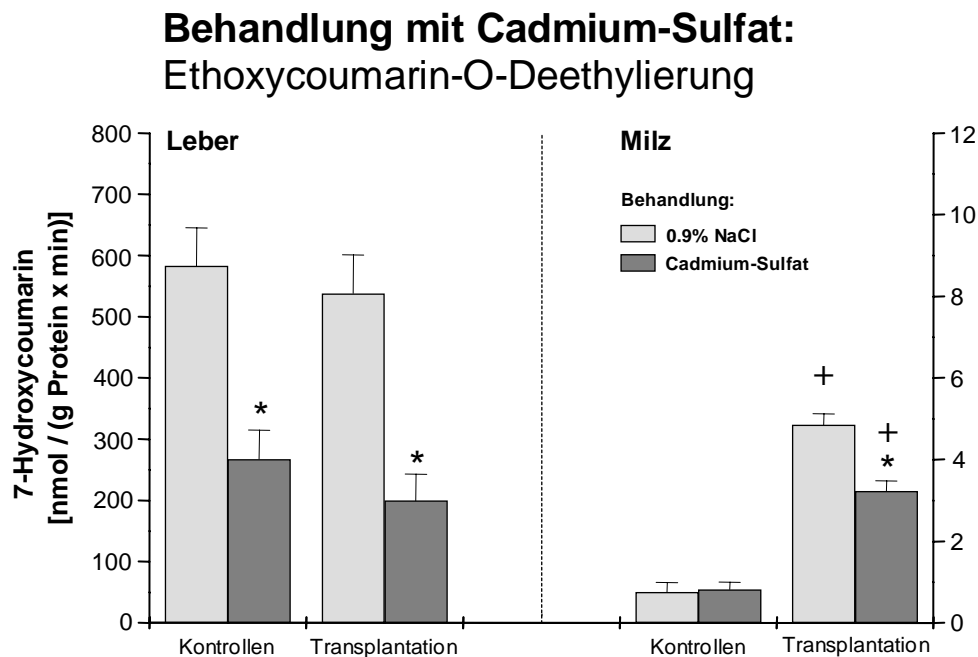


Abbildung 31: ECOD-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. 0,9%iger NaCl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus Behandlung mit 0,9%iger NaCl; +: $p \leq 0,05$ versus nicht transplantierte Kontrolltiere.

In den Lebern sowohl der Kontrolltiere als auch der transplantierten Ratten waren die ECOD-Aktivitäten nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat im Vergleich zur NaCl-Gabe gleichermaßen um ca. 60% vermindert. Beim Vergleich zwischen den Lebern der beiden Tiergruppen stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar.

Unabhängig von der Behandlung ließ sich in den Milzen der Kontrolltiere kaum ein Umsatz nachweisen, wohingegen bei den Transplantat-Empfängern, gleich ob mit Lösungsmittel oder mit Cadmium-Sulfat behandelt, signifikant höhere Werte vorlagen. Wie in den Lebern kam es auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen nach Verabreichung von Cadmium-Sulfat zu einer signifikanten Absenkung der ECOD-Aktivitäten um ca. 47%.

Die in den Milzen gemessenen Umsätze lagen nach Lösungsmittel-Gabe bei ca. 1% der Werte der zugehörigen Lebern.

Die EMND bei Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. 0,9%iger NaCl ist in Abbildung 32 dargestellt:

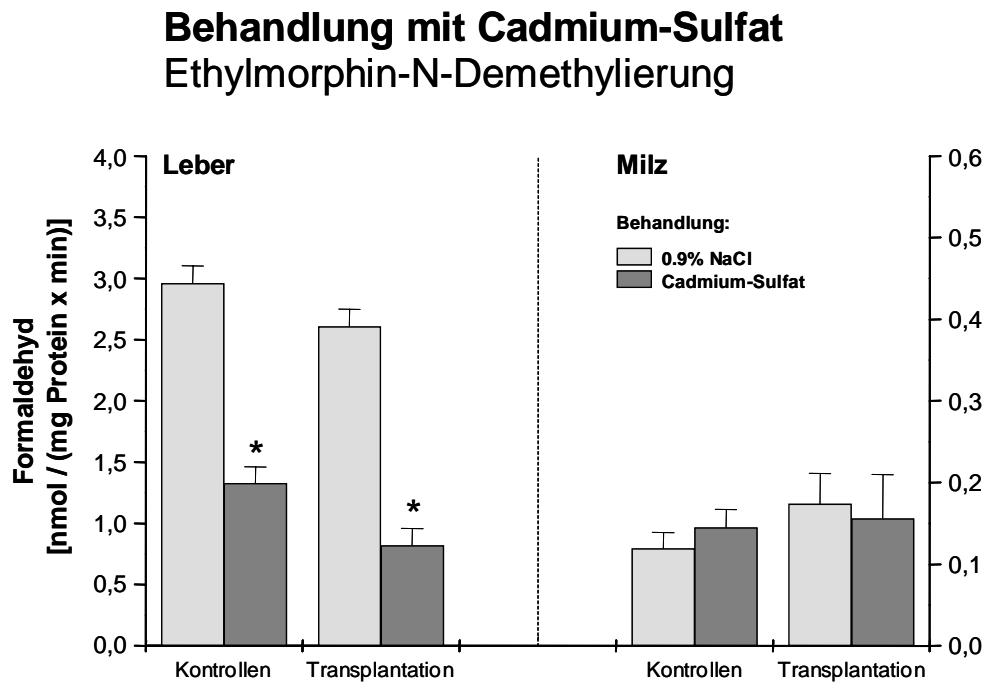


Abbildung 32: EMND-Aktivitäten in Lebern und Milzen von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern nach Behandlung mit Cadmium-Sulfat bzw. 0,9%iger NaCl (Lösungsmittel); angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 8$; *: $p \leq 0,05$ versus Behandlung mit 0,9%iger NaCl.

Die Gabe von Cadmium-Sulfat führte in den Lebern sowohl der nicht-transplantierten Ratten als auch der transplantierten Tiere zu signifikant verminderten Umsätzen im Vergleich zur NaCl-Behandlung. Die Aktivitäten zeigten sich bei den Kontrollratten um ca. 60% verringert, bei den Lebern der transplantierten Tiere waren die Werte sogar um ca. 70% reduziert. Keine signifikanten Unterschiede waren jedoch zwischen den Enzymaktivitäten der Lebern der beiden Tiergruppen zu verzeichnen.

Die Cadmium-Sulfat-Behandlung hatte auf die Milzen der Kontrollen und der Transplantat-Empfänger keinen signifikanten Einfluss. Auch beim Vergleich der Werte der Milzen der nicht transplantierten und der transplantierten Ratten stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar.

7. DISKUSSION

7.1. Behandlung mit Fluoren

7.1.1. Einfluss von Fluoren auf die Organgewichte

Wie schon in früheren Untersuchungen von Danz et al. (1998) und Ayrton et al. (1990) beschrieben, kam es bei den Lebern der Kontrollen und Transplantat-Empfänger zu einer Organgewichtszunahme, die dem mitogenen Einfluss des FENs geschuldet ist. Zwischen den Lebern der beiden Tiergruppen fanden sich unabhängig von der Behandlung keine signifikanten Unterschiede. Die Transplantate in den Milzen hatten offensichtlich keinen Einfluss auf die Gewichte der entsprechenden Lebern.

Unabhängig von der Behandlung war das Gewicht der Transplantat-enthaltenden Milzen signifikant höher als das der entsprechenden Kontrolltiere. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die Transplantate in diesen Milzen zurückzuführen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in den Dissertationen von A. und T. Krauß (2003) und N. Lucas (2003) gemacht. Eine den Lebern entsprechende Gewichtssteigerung, wenn auch nicht signifikant, war auch bei den Transplantat-enthaltenden Milzen zu beobachten, wohingegen die Milzen der nichttransplantierten Kontrolltiere nach Behandlung mit FEN sogar eine signifikante Abnahme ihres Gewichtes aufwiesen. Die Gewichtszunahme der Transplantat-enthaltenden Milzen unter FEN-Behandlung im Vergleich zu den nichttransplantierten Milzen muss folglich durch die mitogenen Effekte des Fluorens auf die Leberzell-Transplantate verursacht sein. Somit ist ein ähnliches Verhalten der Transplantate wie das der ortsständigen Leberzellen zu postulieren.

Die Gewichtsabnahme der mit FEN behandelten, jedoch nicht transplantierten Milzen kann nur mit einem immunsuppressiven Effekt dieser Substanz erklärt werden. Dieser ist zumindest für Mischungen polyzyklischer Aromaten, die auch FEN beinhalten, beschrieben worden (Davis und Safe 1990; Silkworth et al. 1995; Harper et al. 1996).

7.1.2. Einfluss von Fluoren auf den Proteingehalt

Der Proteingehalt zeigte in den orthotopen Lebern nach Behandlung mit FEN eine, wenn auch nicht signifikante Abnahme. In den Milzen der Kontrolltiere war keine entsprechende Tendenz zu erkennen, währenddessen in den Transplantat-enthaltenden Milzen eine signifikante Reduktion des Proteingehaltes zu ersehen war. Es kann also geschlossen werden, dass FEN eine spezifische, den Proteingehalt senkende Wirkung nur an den Leberzellen, gleich ob ortho- oder heterotop gelegen, ausübt. Bei zunehmenden Organgewichten und

anzunehmender Zellzahlerhöhung aufgrund einer erhöhten Mitoserate durch FEN kann man dieses Phänomen nur durch einen relativ erhöhten intrazellulären Gehalt an Zellflüssigkeit erklären.

7.1.3. Einfluss von Fluoren auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

In den Lebern von Kontrollen und transplantierten Tieren war nach FEN-Gabe eine massive Zunahme der EROD-Aktivitäten zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass FEN neben einem mitogenen Effekt auch Enzym-induzierende Eigenschaften, insbesondere auf die CYP-Subfamilie 1A, besitzt. Dies steht in Übereinstimmung mit der bisher veröffentlichten Literatur (Aström et al. 1986, Ayrton et al. 1990, Danz et al. 1992, Chaloupka et al. 1995).

Wie bereits in der Dissertation von A. und T. Krauß (2003) gezeigt, wiesen die Transplantat-enthaltenden Milzen unabhängig von der Behandlung signifikant höhere EROD-Umsätze auf als die entsprechenden Kontrollmilzen, was auf die transplantierten Leberzellen in diesen Organen zurückzuführen ist. Jedoch zeigte sich trotz einer zusätzlichen CYP-Aktivität in den Milzen kein Einfluss auf die Umsätze in den Lebern der Transplantat-Empfänger. Offensichtlich ist die Gesamtmasse der in den Milzen vorhandenen Leberzellen und die zusätzlich vorhandene Biotransformationskapazität zu gering, um die Werte in den Lebern nennenswert zu beeinflussen. Im Gegensatz zu den Kontrollmilzen kam es auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen wie in den Lebern zu einer signifikanten Erhöhung der EROD-Aktivitäten nach FEN-Gabe, was auch hier das Potenzial dieser Substanz CYP der Familie 1A induzieren zu können annehmen lässt. Auch scheint die Lokalisation der Leberzelle keinen Einfluss auf das Ausmaß der CYP1A-Induktion zu besitzen, da sich die EROD-Umsätze in den Transplantat-enthaltenden Milzen nach FEN-Exposition sogar noch relativ stärker erhöhten als die in den ortsansässigen Leberzellen.

Unabhängig vom Wirkungsmechanismus der Enzyminduktion von CYP1A1 über den Ah-Rezeptor gibt es jedoch offensichtlich für polyzyklische Aromaten mit 3-Ring-Struktur einen weiteren Angriffspunkt an der DNS, der zur massiven Induktion von CYP1A2 führt (Chaloupka et al. 1994). Da die EROD-Umsätze durch beide Cytochrome (CYP1A1 und CYP1A2) beeinflusst werden, ist ein gemischt CYP-induzierender Effekt von FEN über beide Wirkungsmechanismen anzunehmen.

7.1.4. Einfluss von Fluoren auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung

Ein ähnliches Bild wie bei der Betrachtung der EROD ergab die Analyse der ECOD-Aktivitäten, die einen Aufschluss über die CYP-Familien 1A, 2A, 2B, 2C und 2E geben. In

den orthotopen Lebern kam es hier in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Aström et al. (1986) zu einer massiven Induktion dieser Modellreaktion.

Wie bereits ebenfalls in der Dissertation von A. und T. Krauß (2003) gezeigt, fanden sich in Milzen der Transplantat-Empfänger unabhängig von der Behandlung signifikant höhere ECOD-Aktivitäten als in den entsprechenden Kontrollmilzen, was wiederum auf die transplantierten Leberzellen in diesen Organen zurückzuführen ist. Kein Einfluss der Transplantate fand sich wiederum auf die Monooxygenaseaktivität in den Lebern.

Auch die Transplantat-enthaltenden Milzen zeigten nach FEN-Behandlung ähnliche Steigerungsraten der ECOD-Aktivitäten wie die Lebern. Diese Erhöhung der Umsätze ist zum einen auf eine Induktion CYP-Familie 1A zurückzuführen, welche über die zuvor geschilderten Mechanismen zustande kommt, zum anderen scheint FEN möglicherweise auch mit dem CAR- oder PXR-Rezeptor zu interagieren, dessen Aktivierung eine Kaskade mit vermehrter Bildung von CYP der Familie 2 nach sich zieht (Fuhr 2000; Rushmore und Kong 2002; Willson und Kliewer 2002; Handschin und Meyer 2003; Pascucci et al. 2003; Wang und LeCluyse 2003).

7.1.5. Einfluss von Fluoren auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass FEN offensichtlich zusätzlich auch in der Lage ist, CYP 3A zu induzieren. So zeigte sich in den Lebern eine im Vergleich zur Behandlung mit dem Lösungsmittel signifikante Steigerung in den EMND-Aktivitäten sowohl bei Kontrolltieren als auch in der Gruppe der Transplantat-Empfänger.

Wie schon in der Dissertation von A. und T. Krauß (2003) konnten auch in der vorliegenden Arbeit keine höheren EMND-Aktivitäten in den Transplantat-enthaltenden Milzen im Vergleich zu den Kontrollorganen beobachtet werden. Der Grund hierfür könnte in der relativ geringen Sensitivität der EMND liegen, da einerseits immunhistochemisch eine Expression von CYP 3A2 in den Transplantaten nachgewiesen werden konnte (Dissertation N. Lucas 2003) und andererseits auch in anderen Untersuchungen signifikant höhere Aktivitäten der Testosteron 2 β - und 6 β -Hydroxylase (beides Modellreaktionen für CYP 3A) in den Milzen der Transplantat-Empfänger als in denen der Kontrolltiere gezeigt werden konnten (Lupp et al. 2004). Aus dem selben Grund war wahrscheinlich auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen kein Steigerungseffekt durch FEN-Gabe nachzuweisen. Wie aufgrund der Ergebnisse mit der EROD und der ECOD zu erwarten, hatten die Transplantate auch keinen Einfluss auf die EMND-Aktivitäten in den entsprechenden Lebern.

Im Wesentlichen sind an den transplantierten fetalen Leberzellen die gleichen mitogenen und Enzym-induzierenden Eigenschaften des FENs wie an den orthotopen Leberzellen nachzuvollziehen. Neu beschreiben konnten wir dabei die Induktion der CYP-Familie 3 durch FEN. Auch ein möglicher immunsuppressiver Einfluss von polyzyklischen Aromaten kann aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Gewichtsreduktion der Normalmilz durch FEN weiter untermauert werden werden.

7.2. Behandlung mit Fluorenon

7.2.1. Einfluss von Fluorenon auf die Organgewichte

In den Lebern der Kontrollen und transplantierten Tiere kam es nach Behandlung mit FON zu einer Organgewichtszunahme, welche sicherlich durch die mitogenen Eigenschaften von FON hervorgerufen wurde. Dies war aufgrund vorhergehender Untersuchungen zu erwarten (Danz et al. 1998).

Wiederum war das Gewicht der Transplantat-enthaltenden Milzen unabhängig von der Behandlung signifikant höher als das der Kontrollmilzen und auch hier war kein Einfluss der Transplantate in den Milzen auf das Gewicht der entsprechenden Lebern zu verzeichnen. Wie auch nach FEN-Verabreichung war nach FON-Gabe in den Milzen nicht-transplanterter Kontrolltiere eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zur Lösungsmittel-Behandlung zu beobachten. Möglicherweise übt FON hemmende Wirkungen auf das Immunsystem, insbesondere auf die Lymphozyten, deren Gehalt in der Milz besonders hoch ist, aus. Diese Wirkung ist der des strukturähnlichen FENs ähnlich, für welches bereits immunsuppressive Eigenschaften postuliert wurden (Davis und Safe 1990; Silkworth et al. 1995; Harper et al. 1996). In den Milzen der transplantierten Tiere ergab sich hingegen keine signifikante Gewichtsabnahme nach FON-Gabe im Vergleich zur DMSO-Behandlung. Der sonst zu beobachtende Gewichtsverlust des Milzgewebes unter FON-Exposition muss also durch eine Gewichtszunahme des enthaltenen Lebergewebes ausgeglichen worden sein. Somit ist die mitogene Wirkung von FON auch an den Leberzelltransplantaten in der Milz indirekt nachzuweisen.

7.2.2. Einfluss von Fluorenon auf den Proteingehalt

Der Proteingehalt in den Lebern beider Tiergruppen, Kontrollen wie Transplantatempfänger, wies nach FON-Gabe, ähnlich wie nach FEN-Verabreichung, einen signifikanten Abfall auf. Bei zunehmenden Organgewichten und anzunehmender Zellzahlerhöhung bei steigender

Mitoserate durch FON kann man dieses Phänomen (wie auch beim FEN) nur durch einen relativ erhöhten intrazellulären Gehalt an Zellflüssigkeit erklären. Leider finden sich hierzu keine vergleichenden Angaben in der Literatur.

Auf die Milzen der Kontrollgruppe zeigte sich kein Effekt, da FON offensichtlich keine die Proteinkonzentration betreffenden Wirkungen an den Milzzellen direkt ausübt. In den Milzen der Transplantat-Empfänger war wie in den Lebern ein Abfall des Proteingehaltes zu verzeichnen. Dieser fiel jedoch nicht signifikant aus, was wahrscheinlich an dem insgesamt deutlich geringeren Leberzellgehalt im Vergleich zu den Normallebern liegt.

7.2.3. Einfluss von Fluorenon auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

Die EROD wies in den Lebern von Kontrollen und transplantierten Tieren nach FON-Gabe massive Steigerungen auf. FON muss also zu einer sehr starken Induktion von CYP1A geführt haben. Ähnlich wie FEN dürfte auch FON als polyzyklischer Kohlenwasserstoff über eine Aktivierung des Ah-Rezeptors mit konsekutiver Steigerung der Transkription der CYP1A1-Gene, aber auch über einen anderen Induktionsmechanismus mit daraus folgender Zunahme der Expression von CYP1A2, gewirkt haben. Eine vergleichbare Zunahme der EROD-Aktivitäten in den Lebern nach FON-Gabe wurde auch schon von Danz et al. (1992) beschrieben.

Bedingt durch die in ihnen enthaltenen Leberzellen wiesen die Milzen der Transplantat-Empfänger wiederum signifikant höhere Aktivitäten auf als die entsprechenden Organe der Kontrolltiere, ohne jedoch die Werte der entsprechenden Lebern zu beeinflussen. Nach FON-Verabreichung war in den Transplantat-enthaltenden Milzen eine im Vergleich zur Lösungsmittelbehandlung prozentual noch stärkere Steigerung der EROD-Umsätze zu beobachten als in den entsprechenden Lebern. Auch hier muss also, ähnlich wie in den Leberzellen, eine Induktion von CYP1A1 (und auch 1A2) stattgefunden haben.

7.2.4. Einfluss von Fluorenon auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung

Auch die ECOD-Umsätze zeigten sich nach Behandlung mit FON im Vergleich zur Lösungsmittelbehandlung sowohl in den Lebern als auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen signifikant und deutlich gesteigert. Es scheint also ähnlich wie beim FEN zu einer Zunahme der Transkription der CYP 2A, 2B, 2C und 2E Gene gekommen zu sein. Anzunehmen ist auch hier eine Interaktion mit den CAR- und/oder den PXR-Rezeptoren. Auf die im Vergleich zu den Transplantat-enthaltenden Milzen niedrigen Aktivitäten in den Milzen der Kontrolltiere hatte FON keinen Einfluss.

7.2.5. Einfluss von Fluorenon auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung

Nach Behandlung mit FON zeigte sich in den Lebern sowohl von Kontrollen als auch von Transplantat-Empfängern eine im Vergleich zur Lösungsmittelgabe nahezu verdoppelte EMND-Aktivität, was wiederum eine Enzyminduktion, in diesem Fall von CYP3A, annehmen lässt. Insgesamt sind also die Induktionseffekte von FON mit denen von FEN vergleichbar.

Wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Sensitivität der EMND (siehe oben) fanden sich bei den Milzen weder nennenswerte Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Transplantat-Empfängern noch ein Einfluss der Behandlung.

FON besitzt insgesamt, ähnlich wie FEN, enzyminduzierende Eigenschaften auf die CYP-Subfamilien 1A, 2A, 2B, 2C 2E und 3A welche es sowohl über die Aktivierung des Ah-Rezeptors (als polyzyklischer Kohlenwasserstoff) als auch über die nukleären Rezeptoren CAR bzw. PXR ausübt. Es besitzt weiterhin mitogene Eigenschaften, sichtbar an den gestiegenen relativen Organgewichten der FON-exponierten Lebern. Darüber hinaus scheint FON wie auch FEN die Proliferation des lymphatischen Gewebes zu hemmen, nachweisbar am sinkenden Gewicht der Kontroll-Milzen unter FON-Behandlung. Die Gleichartigkeit der Wirkungen ist am ehesten mit der sehr ähnlichen Struktur der beiden Substanzen und damit entsprechenden intrazellulären Angriffspunkten zu erklären.

7.3. Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff

7.3.1. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf die Organgewichte

Auf das relative Organgewicht der Lebern der Kontrolltiere und der Transplantat-Empfänger hatte die Behandlung mit CCl₄ keinen Einfluss. Die Organgewichte der Transplantat-enthaltenden Milzen lagen auch in diesen Versuchen wegen dem zusätzlichen Gehalt an Transplantat deutlich höher als die der Kontroll-Milzen. Auch hier bewirkte CCl₄ keine signifikante Änderung der Organgewichte.

7.3.2. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf den Proteingehalt

Der Proteingehalt der Lebern sowohl der Kontrolltiere als auch der transplantierten Ratten sank signifikant nach CCl₄-Behandlung im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe. Dieser Effekt ist durch die im histologischen Bild (Lupp et al. 2000; Dissertation N. Lucas 2003) zu erkennende schwere Schädigung der Lebern zu erklären, mit kompletter perivenöser

Leberzellnekrose und massiver Verfettung der Hepatozyten der angrenzenden intermediären Läppchenzonen und einer begleitenden entzündlichen Infiltration. Auf die Milzen der Kontrollgruppe und der Transplantat-Empfänger fand sich dagegen kein signifikanter Einfluss der CCl₄-Behandlung. Bei den Kontrollmilzen war dies auch nicht zu erwarten, da hier keine Giftung durch CYP stattfindet. Das Fehlen eines Effektes einer CCl₄-Gabe auf den Proteingehalt der Transplantat-enthaltenden Milzen kann nur dadurch erklärt werden, dass der prozentuale Anteil der Leberzell-Transplantate am Gesamtprotein in den Milzen insgesamt zu gering war, um eine solche Substanzwirkung aufzudecken, denn im histologischen Bild waren nach CCl₄-Verabreichung in den Transplantaten ebenso massive Schäden zu verzeichnen wie in den Lebern (Lupp et al. 2000; Dissertation N. Lucas 2003). Auch waren die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Monooxygenase-Modellreaktionen nach CCl₄-Behandlung nicht nur in den Lebern sondern auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen deutlich reduziert (siehe unten).

7.3.3. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

Nach Behandlung mit CCl₄ war sowohl in den Lebern beider Tiergruppen als auch in den Milzen der Transplantat-Empfänger ein signifikanter Abfall der EROD-Umsätze zu verzeichnen. CCl₄ wird zunächst durch CYP2E1 und CYP2B zum Trichlormethylradikal „gegiftet“. Bei der bekannt kurzen Halbwertszeit dieses Radikals muß die Giftung von Tetrachlorkohlenstoff also in den Transplantaten selbst stattgefunden haben, um diese durch Proteinalkylierung und Lipidperoxidation zu schädigen. Eiweißdenaturierung und Membrandefekte verursachen schließlich eine Zellnekrose. Dieser Prozess ist die Ursache der ausgeprägten Hemmung auch des CYP1A1 durch CCl₄ und bestätigt somit die Ergebnisse der bisherigen Literatur (Gumprecht und Franklin 1983; Beyhl und Mayer 1987; Sesardic et al. 1989; Jahn et al. 1993; Wang et al. 1999; Sakai et al. 2001).

In den Milzen der Kontrollgruppe lag die EROD-Aktivität bei beiden Behandlungen auf einem deutlich geringeren Niveau, da hier keine CYP-enthaltenden Hepatozyten vorhanden waren und somit auch keine Beeinflussung der Monooxygenaseaktivität erwartet werden konnte.

Auch in diesen Versuchen konnte kein Einfluss der Transplantate in den Milzen auf die entsprechenden Lebern beobachtet werden.

7.3.4. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung

Auch die ECOD-Aktivitäten waren sowohl in den Lebern von Kontrolltieren und transplantierten Ratten als auch in den Milzen der Transplantat-Empfänger nach CCl₄-Gabe im Vergleich zur Lösungsmittel-Behandlung signifikant und deutlich vermindert. CCl₄ hemmt vor allem auch die Aktivität der CYP2B und 2E1. Über CYP2B und 2E1 wird CCl₄ zunächst „gegiftet“, anschließend kommt es zu einer sogenannten „Suizidhemmung“ dieser Enzyme (Recknagel und Glende 1973; Sesardic et al. 1989; Cazarro et al. 1991; Manno et al. 1992; Allis et al. 1996; Gruebele et al. 1996; Kim et al. 1996; Wong et al. 1998; Zangar et al. 2000; Takahashi et al. 2002). Auch hier bewirken die Membranschädigung durch Lipidperoxidation und der darauf folgende intrazelluläre Verlust auch an anderen CYP-Enzymen eine zusätzliche Verminderung der Monooxygenaseaktivitäten.

In den Milzen der Kontrolltiere war wiederum wegen des fehlenden Gehaltes an heterotopen Leberzellen und damit einer nennenswerten Monooxygenase-Aktivität kein hemmender Effekt zu erwarten. Die unabhängig von der Behandlung zu verzeichnenden sehr niedrigeren ECOD-Umsätze bestätigten dies.

Die Transplantate in den Milzen beeinflussten auch hier die Aktivitäten in den entsprechenden Lebern nicht.

7.3.5. Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung

In den Lebern von beiden Tiergruppen war nach Behandlung mit CCl₄ im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe eine massive Verringerung der EMND-Aktivitäten festzustellen. Diese Hemmung ist über den schon oben beschriebenen intrazellulären Verlust auch an CYP 3A zu erklären.

Wie bereits in den Versuchen mit FEN oder FON war die Sensitivität der EMND offensichtlich auch hier zu gering um Unterschiede in den Aktivitäten zwischen den Milzen der Kontrolltiere und der Transplantat-Empfänger oder um Effekte der CCl₄-Behandlung aufzuzeigen.

In der Gesamtschau kann ein stark hemmender Effekt von CCl₄ auf die Monooxygenaseaktivität aller untersuchten CYP-Subfamilien (CYP1A, 2A, 2B, 2C, 2E und 3A) festgestellt werden, der sich mit den Ergebnissen der bisherigen Literatur deckt. Dieser Effekt läßt sich an den heterotop in die Milz transplantierten Leberzellen in gleichem Ausmaß wie in den Lebern nachweisen.

7.4. Behandlung mit Brombenzol

7.4.1. Einfluss von Brombenzol auf die Organgewichte

Nach BBZ-Gabe zeigte sich in den Lebern der Kontrolltiere und der Transplantat-Empfänger im Vergleich zur Lösungsmittel-Behandlung eine signifikante Reduktion der relativen Organgewichte, was auf der Leberzell-schädigenden Wirkung von BBZ beruhen könnte. In der Literatur werden unter dem Einfluss von BBZ vorwiegend perivenöse, Zeit- und Dosis-abhängige Leberzell-Nekrosen u.a. durch Proteinalkylierung und Lipidperoxidation von Leberzellmembranen beschrieben (Casini et al. 1985; 1987; Klinger et al. 1986; Pompella et al. 1987; Zhou et al. 1995; Lind und Gandolfi 1999; Rombach und Hanzlik 1999; Giffen et al. 2002). Auch bei den Milzen der Transplantat-Empfänger ergaben sich signifikante Gewichtsverluste, die auch hier auf die Nekrose-induzierende Wirkung des BBZ auf die transplantierten Leberzellen zurückgeführt werden können. Aber auch in den „Normalmilzen“ müssen durch BBZ-Wirkung Zellschäden entstanden sein, sichtbar an der signifikanten Reduktion ihrer relativen Organgewichte. Eventuell hat BBZ eine zusätzliche Proliferations-hemmende Wirkung auf die Immunzellen der Milz, insbesondere die Lympho- und Phagozyten, und sorgt über den Weg der verminderten Zellteilung in der Milz zur Organgewichtsverminderung. Dies ist in der bisherigen Literatur jedoch noch nicht beschrieben. Wie zu erwarten lagen die relativen Organgewichte der Milzen mit Transplantat höher als die der Milzen ohne Transplantat.

7.4.2. Einfluss von Brombenzol auf den Proteingehalt

BBZ hatte in der von uns eingesetzten Dosierung weder in den Lebern noch in den Milzen von Kontrollen und Transplantat-Empfängern einen Einfluss auf den Proteingehalt. Eine mögliche Ursache für diesen fehlenden Effekt könnte sein, dass die histologisch sichtbaren Schädigungen durch BBZ in dieser Dosis (Nekrosen, Leberzellverfettung, entzündliche Infiltration) im Vergleich zu den massiven Effekten von CCl₄ nur minimal waren (Lupp et al. 2000).

7.4.3. Einfluss von Brombenzol auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

In den Lebern von Kontrolltieren und Transplantat-Empfängern zeigte sich eine signifikante Abnahme der EROD-Aktivitäten im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe, woraus ein deutlich hemmender Effekt auf die Aktivitäten von CYP1A1/1A2 zu erkennen ist. Die Ursachen hierfür sind am ehesten in den vom BBZ ausgelösten strukturellen Zellveränderungen wie

Proteinalkylierung und Membranzerstörung mit konsekutiver Zellnekrose und Verlust an CYP1A1/1A2 zu sehen.

In den Milzen der Kontrollratten zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der insgesamt sehr niedrigen EROD-Aktivitäten durch BBZ. Im Vergleich hierzu wiesen die Milzen der Lösungsmittel-behandelten Transplantat-Empfänger aufgrund der in ihnen enthaltenden Transplantate deutlich höhere Umsätze auf. Nach BBZ-Gabe kam es hier wie in den Lebern zu einer signifikanten Verminderung der Werte, wofür ebenfalls die beobachteten Zellnekrosen und der Verlust an funktionsfähigem CYP1A1/1A2 verantwortlich sein dürfte (Lupp et al. 2000). Die Transplantate in den Milzen hatten auch hier keinen Einfluss auf die Monooxygenase-Aktivitäten in den entsprechenden Lebern.

7.4.4. Einfluss von Brombenzol auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung

Weder in den Lebern der Kontrolltiere noch in denen der Transplantat-Empfänger ließen sich signifikante Aktivitätsveränderungen bei der ECOD nach Verabreichung von BBZ im Vergleich zur Lösungsmittelgabe zeigen. In den Milzen der Kontrolltiere fanden sich keine nennenswerten Umsätze, wohingegen nach Transplantation von fetalen Leberzellen in die Milz (wie auch schon in den Versuchen zur Untersuchung der Einflüsse von FEN, FON und CCl₄ zu sehen) die ECOD-Aktivitäten deutlich höher waren. Wie in den Lebern waren auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen keine signifikanten Unterschiede in den Umsätzen zwischen Lösungsmittel- und BBZ-Gabe zu verzeichnen. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Effekten auf die EROD und zu der in der Literatur beschriebenen Aktivitätssenkung der CYP-Familie 2 (Klinger et al. 1986; Wang et al. 1999). Diese Diskrepanz läßt sich durch die parallel durchgeführten immunhistochemischen Befunde erklären (Lupp et al. 2000): Im Gegensatz zum CYP1A1 und 3A2 war beim CYP2B1 nur die Zahl der exprimierenden Zellen geringgradig infolge der leichten BBZ-induzierten perivenösen Nekrosen vermindert, nicht jedoch die Intensität der Expression.

7.4.5. Einfluss von Brombenzol auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung

In den Lebern beider Tiergruppen führte die Verabreichung BBZ im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe zu einer signifikanten und deutlichen Verminderung der EMND-Aktivitäten, was sicher wiederum auf die leberzellschädigende Wirkung von BBZ zurückzuführen ist (Lupp et al. 2000).

Aufgrund der geringen Sensitivität der EMND fanden sich auch hier keine Unterschiede in den Enzymaktivitäten zwischen den Milzen der Kontrolltiere und der Transplantat-

Empfänger. Bei beiden Tiergruppen kam es jedoch nach BBZ-Gabe zu einer deutlichen Erhöhung der EMND, obwohl in den parallel durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen (Lupp et al. 2000) in den Transplantaten eine Abnahme der CYP3A2-Expression verzeichnet werden konnte. Dieser Effekt muß also auf eine Wirkung von BBZ auf das spezifische Milzgewebe zurückzuführen sein, obwohl sich immunhistochemisch hierzu keine Anhaltspunkte finden ließen (Lupp et al. 2000).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass Brombenzol vor allem das CYP1A1 und 3A2 zu hemmen und diesen Effekt im wesentlichen über eine Zerstörung der zellulären Strukturen und damit einen Verlust an den o.g. Enzymen zu bewirken scheint, sichtbar an den verminderten Aktivitäten der EROD und EMND. Dabei verhalten sich die Transplantate den orthotopen Leberzellen ähnlich. Auf die ECOD-Umsätze und somit auf die CYP-Familie 2 hatte BBZ in der von uns eingesetzten Dosierung sowohl in den Lebern als auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen keinen signifikanten Einfluss.

7.5. Behandlung mit Cadmium-Sulfat

7.5.1. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf die Organgewichte

Die relativen Organgewichte der Lebern zeigten sich weder durch die Transplantate in den Milzen noch durch Cadmium-Sulfat-Gabe signifikant verändert. Ein Einfluss dieser Substanz auf den Strukturstoffwechsel von Leberzellen kann somit als unwahrscheinlich angesehen werden. Wie auch schon bei den Untersuchungen zu FEN, FON, CCl₄ und BBZ gezeigt, waren die Gewichte der Transplantat-enthaltenden Milzen, bedingt durch die in ihnen enthaltenden Transplantate, höher als die der entsprechenden Kontrollorgane.

7.5.2. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf den Proteingehalt

Nach Gabe von Cadmiumsulfat fiel der Proteingehalt nur in den Lebern und in den Milzen der Transplantatempfänger ab, währenddessen in den Milzen der Kontrollgruppe keine Unterschiede zur Lösungsmittel-Behandlung zu sehen waren. Diese Abnahme im Proteingehalt könnte auf der Beeinträchtigung der Synthese und dem verstärkten Abbau Hämhaltiger Proteine wie der CYPs durch Cadmium beruhen (Krasny und Holbrook 1977; 1978; Eaton et al. 1980).

7.5.3. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

In den Lebern von Kontrollen und Transplantat-Empfängern konnte nach Cadmium-Sulfat-Behandlung eine starke Abnahme der Umsätze im Vergleich zur Lösungsmittel-Gabe beobachtet werden. Dies ist übereinstimmend mit den bisherigen Untersuchungen von Kadiiska und Stoychev (1980), Kadiiska et al. (1983) und Jahn und Klinger (1982; 1989). Krasny und Holbrook (1977; 1978) sowie Eaton et al. (1980) fanden, dass Cadmium in vivo die Aktivität der δ -Aminolävulinsäuresynthetase hemmt, was dazu führen kann, dass die Synthese aller Häm-enthaltenden Proteine, also auch die der CYPs, beeinträchtigt ist. Weiterhin konnten sie eine Erhöhung der Aktivität der Häm-Oxygenase und damit des CYP-Katabolismus sowie eine Reduktion des CYP-Gehaltes durch diese Schwermetalle zeigen. In den Transplantat-enthaltenden Milzen fiel dieser Effekt nicht signifikant aus, was durch eine vorherige Bindung eines Hauptteils des Cadmiums in der Leber an Metallothionine bedingt sein könnte.

7.5.4. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung

Nach Cadmium-Sulfat-Gabe sank die ECOD-Aktivität sowohl in den Lebern transplantiert und nicht-transplantiert Ratten als auch in den Transplantat-enthaltenden Milzen deutlich ab, woraus ersichtlich wird, dass Cadmium-Sulfat unabhängig von der Lokalisation der Leberzellen auch die Aktivität der CYPs 2A, 2B, 2C und 2E hemmt. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Hemmung der ECOD-Aktivitäten in den Lebern steht wieder in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Kadiiska und Stoychev (1980), Kadiiska et al. (1983) und Jahn und Klinger (1982; 1989).

Auch in den vorliegenden Untersuchungen waren die Aktivitäten in den Transplantat-enthaltenden Milzen deutlich höher als in den entsprechenden Kontrollorganen und wiederum fand sich kein Einfluss der Transplantate in den Milzen auf die Monooxygenasefunktion der Lebern und deren Beeinflussbarkeit durch eine Fremdsubstanz.

7.5.5. Einfluss von Cadmium-Sulfat auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung

Wie aus vorangegangenen Untersuchungen (Kadiiska und Stoychev 1980; Kadiiska et al. 1983; Jahn und Klinger 1982; 1989) und aufgrund des wahrscheinlichen Wirkungsmechanismus von Cadmium (Krasny und Holbrook 1977; 1978; Eaton et al. 1980) zu erwarten, hemmte Cadmium-Sulfat auch die EMND-Aktivitäten in den Lebern beider Tiergruppen gleichermaßen deutlich.

Wie schon bei den Untersuchungen zu den Einflüssen von FEN, FON, CCl₄ und BBZ fanden sich auch hier (wahrscheinlich aufgrund einer geringen Sensitivität dieser Modellreaktion) weder Unterschiede in den EMND-Aktivitäten zwischen den Milzen der Kontrolltiere und der Transplantat-Empfänger noch ein Einfluss der Cadmium-Sulfat-Behandlung auf die Transplantat-enthaltenden Milzen.

Zusammenfassend kann übereinstimmend mit der vorliegenden Literatur (Krasny und Holbrook 1977; 1978; Eaton et al. 1980; Kadiiska und Stoychev 1980; Kadiiska et al. 1983; Jahn und Klinger 1982; 1989) festgestellt werden, dass Cadmium-Sulfat eine ausgeprägte Hemmung aller untersuchten CYP-Familien bewirkte und dass sich dieser Effekt nicht nur an den Leberzellen der orthotopen Leber, sondern auch an den Transplantaten auswirkte. Da ein großer Teil des Cadmiumsulfats bereits in der Leber an Metallothionine gebunden wird fällt die Hemmung der Cytochrome in der Milz allerdings geringer aus.

7.6. Allgemeine Schlussfolgerungen und Ausblick

In der Gesamtschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die Leberzell-Transplantate sehr ähnliche Reaktionen auf die untersuchten Substanzen vor allem im Hinblick auf die Monooxygenase-Funktion aufweisen. Dabei weist insbesondere die Induzier- und Hemmbarkeit bestimmter CYPs auf die aktive Teilnahme der transplantierten Leberzellen am Entgiftungsstoffwechsel hin. Die vergleichbare Reaktion auf Veränderungen des Stoffwechsels ist eine der Anforderungen an die Transplantate, vor allem im Hinblick auf die Ansprüche, die im Rahmen einer Leberersatztherapie beim akuten oder chronischen Leberversagen an sie gestellt werden. Aus den vorliegenden Resultaten wird diese Fähigkeit ersichtlich und stellt die Eignung von in die Milz transplantierten Leberzellen als partiellen Ersatz für die Leber sehr gut dar. Die Literatur bestätigt diese Eignung in zahlreichen Tierversuchen und ersten erfolgreichen Leberzelltransplantationen auch beim Menschen (siehe Kapitel 3.5.).

Daneben ist zu festzuhalten, dass die Transplantate auch zum Ersatz von Teilfunktionen der Leber, im Besonderen der Synthese bestimmter Proteine wie dem Alpha-1-Antitrypsin, der UDP-Glucuronosyltransferase und auch der Gerinnungsfaktoren, in Betracht kommen. Die Literatur berichtet hier bereits über den erfolgreichen Einsatz von Leberzell-Transplantaten an verschiedenen Tiermodellen und auch schon am Menschen (siehe Kapitel 3.5). Bei einigen Tierversuchen wurde hierbei zum Teil auch eine Rücktransplantation von gentechnisch veränderten autologen Hepatozyten vorgenommen. Diese Methode hätte, beim Menschen

angewandt, den enormen Vorteil, dass bei der Transplantation von zwar veränderten, jedoch von der MHC-Struktur her körpereigenen Zellen, keine lebenslange Immunsuppression notwendig wäre.

Weitere Einsatzgebiete für Leberzelltransplantationen beim Menschen wären aus meiner Sicht Erkrankungen wie der Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, der Morbus Wilson oder auch die Hämophilie A und B, bei denen jeweils die genetische Störung auf der Ebene der Hepatozyten liegt. Diese Erkrankungen haben hohe Behandlungskosten, die bisher fehlende Möglichkeit der kausalen Therapie und eine hohe Rate an krankheitsbedingten Komplikationen mit konsekutiven Krankenhausaufenthalten gemeinsam. Bei diesen Leiden würde auch eine geringe Aktivität (ca. 3-10%) der jeweils fehlenden Enzyme genügen um die Symptomatik zu beheben (Asonuma et al. 1992; Shatford et al. 1993; Vons 2001). Demnach wäre hier meines Erachtens der Einsatz von Hepatozyten-Transplantaten ideal, gleich ob autogen nach vorheriger genetischer Veränderung oder allogenen mit nachfolgender Immunsuppression. Damit ließen sich die Therapiekosten deutlich senken und, falls die Transplantate im Empfänger lebenslang verbleiben, eine endgültige Heilung erreichen. Hierzu wären jedoch weitere Untersuchungen zum Langzeit-Überleben der transplantierten Hepatozyten und eine Überprüfung der Wirksamkeit der o.g. Behandlungsoptionen an geeigneten Tiermodellen notwendig.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Agrawal AK, Shapiro BH. 2000. Differential expression of gender-dependent hepatic isoforms of cytochrome P-450 by pulse signals in the circulating masculine episodic growth hormone profile of the rat. *JPET*, 292: 228-237.

Agrawal AK, Shapiro BH. 2001. Intrinsic signals in the sexually dimorphic circulating growth hormone profiles of the rat. *Mol Cell Endocrinol*, 173: 167-181.

Aitio A. 1978. A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal Biochem*, 85: 488-491.

Allis JW, Brown BL, Simmons JE, Hatch GE, McDonald A, House DE. 1996. Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: the central role of cytochrome P450. *Toxicol*, 112: 131-140.

Ambrosino G, Varotto S, Basso S, Bettiol M, Cecchetto A, Carraro P, Naso A, Lumachi F, De Silvestro G, Plebani M, Davia G, Abatangelo G, D'Amico D. 2001. Hepatocyte transplantation: an experimental study to treat acute liver failure in pigs. *Transplant Proc*, 33: 62-65.

Arkadopoulos N, Lilja H, Suh KS, Demetriou AA, Rozga J. 1992. Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology*, 28: 1365-1370.

Arkadopoulos N, Papalois A, Pataryas T, Golematis B, Papadimitriou J. 1994. Experimental transplantation of hepatocytes in cases of toxic acute liver failure. *Transpl Int*, 7 (Suppl 1): S171-S174.

Arkadopoulos N, Chen SC, Khalili TM, Detry O, Hewitt WR, Lilja H, Kamachi H, Petrovic L, Mullon CJP, Demetriou AA, Rozga J. 1998. Transplantation of hepatocytes for preservation of intracranial hypertension in pigs with ischemic liver failure. *Cell Transplant*, 7: 357-363.

Asonuma K, Gilbert JC, Stein JE, Takeda T, Vacanti JP. 1992. Quantitation of transplanted hepatic mass necessary to cure the Gunn rat model of hyperbilirubinemia. *J Pediatr Surg*, 27: 298-301.

- Aström A, Birberg W, Pilotti A, De Pierre JW. 1986. Induction of different isozymes of cytochrome P-450 and of microsomal epoxide hydroxylase in rat liver by 2-acetaminofluorene and structurally related compounds. *Eur J Biochem*, 154: 125-134.
- Ayrton AD, Mc Farlane M, Walker R. 1990. The induction of P450 I proteins by aromatic amines may be related to their carcinogenic potential. *Carcinogenesis*, 11: 803-809.
- Bass NM. 1990. Fatty-acid binding protein expression in the liver: its regulation and relationship to the zonation of fatty acid metabolism. *Mol Cell Biochem*, 98: 167-176.
- Baumgartner D, LaPlante-O'Neill PM, Sutherland DER, Najarian JS. 1983. Effects of intrasplenic injection of hepatocytes, hepatocyte fragments and hepatocyte culture supernatants on D-galactosamine-induced liver failure in rats. *Eur Surg Res*, 15: 129-135.
- Benedetti E, Kirby JP, Asolati M, Blanchard J, Ward MG, Williams R, Hewett TA, Fontaine M, Pollak R. 1997. Intrasplenic hepatocyte allotransplantation in dalmatian dogs with and without cyclosporine immunosuppression. *Transplantation*, 63: 1206-1209.
- Berishvili E, Liponava E, Kochlavashvili N, Kalandarishvili K, Benashvili L, Gupta S, Kakabadze Z. 2003. Heterotopic auxiliary liver in an isolated and vascularized segment of the small intestine in rats. *Transplantation*, 75: 1827-1832.
- Berman E, House DE, Allis JW, Simmons JE. 1992. Hepatotoxic interactions of ethanol with allyl alcohol or carbon tetrachloride in rats. *J Toxicol Environ Health*, 37: 161-176.
- Bernd HM, Auth MKH, Encke A. 1995. Hepatozyten, Zukunftshoffnung oder baldige Alternative zur Lebertransplantation? *Deutsches Ärzteblatt*, 92: 95-99.
- Beyhl FE, Mayer DG. 1987. Studies on liver toxicants. Mixed function oxidase activities and hemoprotein contents in livers of rats poisoned with bromobenzene. *Arch Toxicol*, 60: 109-111.
- Borel-Rinkes IH, Bijma AM, Kappers WA, Sinaasappel M, Hoek FJ, Jansen PLM, Valerio D, Terpstra OT. 1992. Evidence of metabolic activity of adult and fetal rat hepatocytes transplanted into solid supports. *Transplantation*, 54: 210-214.
- Cai J, Ito M, Nagata H, Westerman KA, LaFleur D, Chowdhury JR, Leboulch P, Fox IJ. 2002. Treatment of liver failure in rats with end-stage cirrhosis by transplantation of immortalized hepatocytes. *Hepatology*, 36: 386-394.

Casini AF, Pompella A, Comporti M. 1985. Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid-peroxidation and necrosis. *Am J Pathol*, 118: 225-237.

Casini AF, Maellaro E, Pompella A, Ferrali M, Comporti M. 1987. Lipid-peroxidation, protein thiols and calcium homeostasis in bromobenzene-induced liver-damage. *Biochem Pharmacol*, 36: 3689-3695.

Cazarro S, Ferrara R, Rigotti P, Ancona E, Manno M. 1991. Inactivation of human cytochrome-P-450 by carbon-tetrachloride and halothane. *J Toxicol Clin Exper*, 11: 309-310.

Chaloupka K, Santostefano M, Goldfarb IS, Liu G, Myers MJ, Tsyrolv IB, Gelboin HH, Krishnan V, Safe S. 1994. Aryl-hydrocarbon (Ah) receptor-independent induction of CYP1A2 gene-expression by acenaphthylene and related compounds in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis*, 15: 2835-2840.

Chaloupka K, Steinberg M, Santostefano M, Rodriguez LV, Goldstein L, Safe S. 1995. Induction of CYP1A-1 and CYP2A-1 gene-expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic-hydrocarbons in B6C3F mice. *Chem Biol Interact*, 96: 207-221.

Chowdhury JR, Grossmann M, Gupta S, Chowdhury NR, Baker JR, Wilson JM. 1991. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science*, 254: 1802-1805.

Cuervas-Mons V, Cienfuegos JA, Maganto P, Golitsin A, Eroles G, Castillo-Olivares J, Segovia De Arana JM. 1984. Time-related efficacy of liver cell isografts in fulminant hepatic failure. *Transplantation*, 38: 23-25.

Cuervas-Mons V, Cienfuegos JA, Maganto P, Rodriguez V, Eroles G, Pinedo I, Santamaria L, Ramos J, Ortiz JL, Castillo-Olivares J, Segovia De Arana JM. 1985. Long-term evaluation of isolated syngeneic hepatocytes transplanted into the normal rat spleen by Tc-99m-HIDA scintigraphy. *Transplantation*, 39: 87-90.

Danz M, Bräuer R. 1988. Carcinogenic and non-carcinogenic fluorene derivatives: induction of thymocyte stimulating serum factors by 2-acetylaminofluorene (AAF) and their synergy with lymphocyte mitogens. *Exp Pathol*, 34: 217-221.

Danz M, Müller D, Räthe H. 1992. Fluorenone and 2-benzoylfluorenone: different short-term effects on drug-metabolizing liver enzymes and on cell proliferation. *Exp Toxic Pathol*, 44: 259- 261.

Danz M, Hartmann A, Blaszyk H. 1998. Mitogenic short-term effects on hepatocytes and adrenocortical cells: phenobarbital and reserpine as compared with carcinogenic and non-carcinogenic fluorene derivatives. *Exp Toxic Pathol*, 50: 416-424.

Darby H, Gupta S, Johnstone R, Selden C, Hodgson HJ. 1986. Observations on rat spleen reticulum during the development of syngeneic hepatocellular transplants. *Br J Exp Path*, 67: 329-339.

David P, Alexandre E, Audet M, Chenard-Neu MP, Wolf P, Jaeck D, Azimzadeh A, Richert L. 2001. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplantated rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats (NAR). *Cell Transplant*, 10: 67-80.

Davis D, Safe S. 1990. Immunosuppressive activities of polychlorinated biphenyls in C57BL/6N mice: structure-relationships as Ah receptor agonists and partial antagonists. *Toxicology*, 63: 97-111.

Degtyarenko KM, Fábíán P. 2004. Directory of P450 containing systems. <http://www.icgeb.trieste.it/p450/>.

Demetriou AA, Felcher A, Moscioni AD 1991. Hepatocyte transplantation: a potential treatment for liver disease. *Dig Dis Sci*, 36: 1320-1326.

Dunn TB, Kumins NH, Raofi V, Holman DM, Mihalov M, Blanchard J, Law WR, Rastellini C, Benedetti E. 2000. Multiple intrasplenic hepatocyte transplantation in the dalmatian dog. *Surgery*, 127: 193-199.

Eaton DL, Stacey NH, Wong KL, Klaassen CD. 1980. Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. *Toxicol Appl Pharmacol*, 55: 393-402.

Ebata H, Onodera K, Sawa M, Mito M. 1988. A study of liver regeneration using fetal rat liver tissue transplanted into the spleen. *Jap J Surg*, 18: 540-547.

Eroles G, Maganto P, Cienfuegos JA, Castillo-Olivares JL, Segovia JM. 1986. Liver cell transplantation: its application to chronic liver disease. *Transplant Proc*, 18: 1221-1223.

Fisher RA, Bu D, Thompson M, Tisnado J, Prasad U, Sterling R, Posner M, Strom S. 2000. Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion. *Transplantation*, 69: 303-307.

Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. 1998. Treatment of the Crigler-Najjar-syndrome type I with hepatocyte transplantation. *New Engl J Med*, 338: 1422-1426.

Frankel EN. 1983. Volatile lipid oxidation products. *Prog Lipid Res*, 22: 1-33.

Fuhr U. 2000. Induction of drug metabolising enzymes. Pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin Pharmacokinet*, 38: 493-504.

Fujikura Y, Kuniki H, Sawada T, Hamano K, Akino T, Shigetomi M, Hirozane A, Fukumoto T. 1994. Membrane antigen expression of syngenetically but heterotopically transplanted hepatocytes in rats. *Cell Transplant*, 3: 23-31.

Fuller BJ, Lewin J, Sage L. 1983. Ultrastructural assessment of cryopreserved hepatocytes after prolonged ectopic transplantation. *Transplantation*, 35: 15-18.

Fuller BJ. 1988. Transplantation of isolated hepatocytes: a review of current ideas. *J Hepatol*, 7: 368-378.

Gebhardt R. 1992. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmac Ther*, 53: 275-354.

Genin B, Anderegg E, Rubbia-Brandt L, Birraux J, Morel P, Coultre C. 1999. Improvement of the effect of hepatocyte isograft in the Gunn rat by cotransplantation of islets of Langerhans. *J Pediatr Surg*, 34: 321-324.

Gibson GG, Skett P, Hrsg. 1994. Introduction into drug metabolism. 2. Aufl. London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne: Chapman & Hall, 1-133.

Giffen PS, Pick CR, Price MA, Williams A, York MJ. 2002. Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity – its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. *Toxicol Pathol*, 30: 365-372.

Gonzales FJ. 1992. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci*, 13: 346-352.

Goudonnet H, Magdalou J, Mounie J, Naoumi A, Viriot ML, Escousse A, Siest G, Truchot R. 1990. Differential action of thyroid hormones and chemically related compounds on the activity of UDP-glucuronosyltransferases and cytochrome P-450 in rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1035: 12-19.

Groothuis GMM, Meijer DKF, Hardonk MJ. 1983. Morphological studies on selective acinar liver damage by N-hydroxy-2-acetylaminofluorene and carbon tetrachloride. *Arch Pharmacol*, 322: 298-300.

Grossman M, Rader DJ, Muller DWM, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB, Raper SE, Wilson JM. 1995. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nature Med*, 1: 1148-1154.

Groth CG, Arborgh B, Björken C, Sundberg B, Lundgren G. 1977. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc*, 9: 313-316.

Gruebele A, Zawaski K, Kaplan D, Novak RF. 1996. Cytochrome P4502E1- and cytochrome P4502B1/2-catalyzed carbon tetrachloride metabolism: effects on signal transduction as demonstrated by altered immediate-early (c-Fos and c-Jun) gene expression and nuclear AP-1 and NF-kappa B transcription factor levels. *Drug Metab Dispos*, 24: 15-22.

Guha C, Parashar B, Deb NJ, Garg M, Gorla GR, Singh A, Roy-Chowdhury N, Vikram B, Roy-Chowdhury J. 2002. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology*, 36: 354-362.

Gumprecht JR, Franklin MR. 1983. The alteration of hepatic cytochrome P-450 subpopulations of phenobarbital-induced and uninduced rat by regioselective hepatotoxins. *Drug Metab Dispos*, 11: 312-318.

Gupta S, Vemuru RP, Lee CD, Yerneni PR, Aragona E, Burk RD. 1994. Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad: implications for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther*, 5: 959-967.

- Habibullah CM, Syed ICH, Qamar A, Taher-Uz Z. 1994. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation*, 58: 951-977.
- Habibullah CM, Syed ICH, Qamar A, Taher-Uz Z. 1995. Xenotransplantation of UV-B-irradiated hepatocytes. Survival and immune response. *Transplantation*, 58: 1495-1497.
- Hadjiolov N, Bitsch A, Neumann HG. 1995. Early initiating and promoting effects in 2-AAF-induced rat liver carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Cancer Lett*, 98: 39-46.
- Hagihara M, Shimura T, Takebe K, Munkhbat B, Tsui K. 1994. Effects of iso and xeno fetal liver fragments transplantation on acute and chronic liver failure in rats. *Cell Transplant*, 3: 283-290.
- Hamazaki K, Doi Y, Koide N. 2002. Microencapsulated multicellular spheroids of rat hepatocytes transplanted intraperitoneally after 90% hepatectomy. *Hepato-Gastroenterol*, 49: 1514-1516.
- Handschin C, Meyer UA. 2003. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 55: 649-673.
- Harauchi T, Hirata M. 1994. Effect of P-450 inducers on glutathione (GSH) depletion by bromobenzene in primary cultures of dog hepatocytes. *Biol Pharmac Bull*, 17: 658-661.
- Harper N, Steinberg M, Safe S. 1996. Immunotoxicity of a reconstituted polynuclear aromatic hydrocarbon mixture in B6C3F1 mice. *Toxicol*, 109: 31-38.
- Henne-Bruns D, Ambrass FO, Schmiegelow P, Höhne M, Paul D, Kremer B. 1989. Intrasplenic hepatocyte transplantation: evaluation of DNA-synthesis and proliferation in auxiliary transplanted cells. *Res Exp Med*, 189: 295-302.
- Henne-Bruns D, Sümpelmann D, Krüger U, Kremer B. 1990. Intraperitoneale Hepatozytentransplantation: morphologische Befunde und klinische Relevanz. *Helv Chir Acta*, 57: 717-723.
- Hiraoka T, Hägerstrand I, Bengmark S. 1983. Attempts at autologous transplantation of sliced liver to the subcutaneous tissue. *Eur Surg Res*, 15: 37-44.

Holzman MD, Rozga J, Neuzil DF, Griffin D, Moscioni AD, Demetriou AA. 1993. Selective intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic and Gunn rats. *Transplantation*, 55: 1213-1219.

Hoshi K, Senda N, Fujino S. 1989. Acute effect of amitriptyline, phenobarbital or cobaltous chloride on delta-aminolevulinic acid synthetase, heme oxygenase and microsomal heme content and drug metabolism in rat liver. *Jp J Pharmacol*, 50: 289-293.

Ikebukuro H, Inagaki M, Mito M, Kasai S, Ogawa K, Nozawa M. 1999. Prolonged function of hepatocytes transplanted into the spleens of Nagase analbuminemic rats. *Eur Surg Res*, 31: 39-47.

Jaffé V, Darby H, Selden S, Hodgson HJF. 1988. The growth of transplanted liver cells within the pancreas. *Transplantation*, 45: 497-498.

Jahn F, Klinger W. 1982. Influence of age on in vitro effect of cadmium on rat liver cytochrome P-450 concentration and monooxygenases activity. *Acta Pharmacol Toxicol*, 50: 85-88.

Jahn F, Klinger W. 1989. Influence of prenatal administration of cadmium on postnatal development and inducibility of hepatic monooxygenases in rats. *Pharmacol Toxicol*, 64: 291-292.

Jahn F, Reuter A, Karge E, Danz M, Klinger W. 1993. Age dependent different influence of carbon tetrachloride on biotransformation of xenobiotics, glutathione content, lipid peroxidation and histopathology of rat liver. *Exp Toxic Pathol*, 45: 101-107.

Jamal HZ, Weglarz TC, Sandgren EP. 2000. Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity in vivo. *Gastroenterology*, 118: 390-394.

Jirtle RL, Biles C, Michalopoulos G. 1980. Morphologic and histochemical analysis of hepatocytes transplanted into syngeneic hosts. *Am J Pathol*, 101: 115-126.

Jirtle RL, Michalopoulos G. 1982. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. *Cancer Res*, 42: 3000-3004.

Jollow DJ, Mitchell JR, Zampagli N, Gillette JR. 1974. Bromobenzene-induced liver necrosis – protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as hepatotoxic metabolite. *Pharmacology*, 11: 151-169.

Jungermann K, Kietzmann T. 1996. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Ann Rev Nutr*, 16: 179-203.

Kadiiska M, Stoychev T. 1980. Effect of acute intoxication with some heavy metals on drug metabolism. *Arch Toxicol, Suppl* 4: 363-365.

Kadiiska MB, Stoytchev TS, Jahn F, Klinger W. 1983. Effect of cadmium in vitro on benzphenamine-N-demethylation and ethoxyresorufin-O-deethylation in rats of different age. *Acta Physiol Pharmacol Bulgarica*, 9: 21-30.

Kaliman PA, Nikitchenko IV, Sokol OA, Strelchenko EV. 2001. Regulation of heme oxygenase activity in rat liver during oxidative stress induced by cobalt chloride and mercury chloride. *Biochemistry (Moscow)*, 66: 77-82.

Kato K, Hodgson WJB, Onodera K, Matsuda M, Kusano M, Mito M. 1992. Developmental regulation of cytochrome P-450 of intrasplenically transplanted fetal hepatocytes in spontaneously hypertensive rats. *Transplant Proc*, 24: 2956-2959.

Kato K, Hodgson WJB, Lutton JD, Abraham NG. 1994. Developmental expression of cytochrome P450s within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes from spontaneously hypertensive rats. *Cell Transplant*, 3: 15-21.

Kato K, Hodgson WJB, Abraham NG, Onodera K, Matsuda M, Kasai S, Mito M. 1995. Effect of 70% partial hepatectomy on developmental expression of cytochrome P450 IVA1 within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes from spontaneously hypertensive rats. *Intern Hepatol Commun*, 3: 254-259.

Kato K, Hodgson WJB, Abraham NG, Onodera K, Imai M, Kasai S, Mito M. 1996. Expression and inducibility of cytochrome P450 IIIA family within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes. *Cell Transplant*, 5: 117-122.

Kato K, Onodera K, Sakata H, Imai H, Kato J, Hodgson WJB, Abraham NG, Kasai S, Mito M. 1998. Fatty acid ω and (ω -1)-oxidation within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes. *Transplantation*, 66: 441-445.

Kawai M, Bandiera SM, Chang TKH, Bellward GD. 2001. Effect of exogenous growth hormone on somatic growth, gonadal development and hepatic CYP2C11 and CYP2C12 expression in prepubertal intact male rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 79: 352-361.

- Kim SG, Chung HC, Cho JY. 1996. Molecular mechanism for alkyl sulfide-modulated carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: the role of cytochrome P450 2E1, P450 2B and glutathione S-transferase expression. *J Pharmacol Exp Ther*, 277: 1058-1066.
- Kim WH, Lee JH, Han SU, Jin YM, Kwak YS, Wang HJ, Kim MW. 2000. Systematic analysis of the effects of hepatocyte transplantation on rats with acute liver failure. *Hepatogastroenterol*, 47: 371-374.
- Kim BH, Han YS, Dong SH, Kim HJ, Chang YW, Lee JI, Chang R. 2002. Temporary amelioration of bilirubin conjugation defect in Gunn rats by transplanting conditionally immortalized hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol*, 17: 690-696.
- Kleeberg U, Klinger W. 1982. Sensitive formaldehyde determination with Nash's reagent and a "tryptophan reaction". *J Pharmacol Meth*, 8: 19-31.
- Klinger W, Müller D. 1974. The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods. *Z Versuchstierk*, 16: 146-153.
- Klinger W, Müller D. 1977. Ethylmorphine N-demethylation by liver homogenate of newborn and adult rats; enzyme kinetics and age course of Vmax and Km. *Acta Biol Med Germ*, 36: 1149- 1159.
- Klinger W, Devereux T, Maronpot R, Fouts J. 1986. Functional hepatocellular heterogeneity determined by the hepatotoxins allyl alcohol and bromobenzene in immature and adult Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 83: 108-114.
- Klinger W, Devereux T, Fouts JR. 1988. Functional and structural zonal hepatocyte heterogeneity – dynamics and ontogenetic development. *Exp Pathol*, 35: 69-91.
- Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Hammel JM, Fox IJ. 2000. Treatment of carbon tetrachloride and phenobarbital-induced chronic liver failure with intrasplenic hepatocyte transplantation. *Cell Transplant*, 9: 671-673.
- Kokudo N, Otsu I, Okazaki T, Takahashi S, Sanjo K, Adachi Y, Makino S, Nozawa M. 1995. Long-term effects of intrasplenically transplanted adult hepatocytes and fetal liver in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Transpl Int*, 8: 262-267.
- Krasny HC, Holbrook DJ. 1977. Effects of cadmium on microsomal hemoproteins and heme oxygenase in rat liver. *Mol Pharmacol*, 13: 759-765.

Krasny HC, Holbrook DJ. 1978. Effect of cadmium on heme oxygenase and hemoproteins in smooth and rough endoplasmatic reticulum of rat liver. *Biochem Pharmacol*, 27: 364-366.

Krauß AK, Krauß T. 2003. Transplantation einer syngen fetalen Lebergewebesuspension in die Milz von Ratten: Funktionelle Charakterisierung der Transplantate zu verschiedenen Zeiten nach Transplantation und Untersuchung des Einflusses von Induktoren, Mitogenen und Zellgiften sowie einer partiellen Hepatektomie im Vergleich zur Normalleber [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.

Kusano M, Ebata H, Onishi T, Saito T, Mito M. 1981. Transplantation of cryopreserved isolated hepatocytes into the rat spleen. *Transplant Proc*, 13: 848-854.

Kusano M, Mito M. 1982. Observation on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterol*, 82: 616-628.

Lau SS, Zannoni VG. 1981. Bromobenzene metabolism in the rabbit – specific forms of cytochrome-P-450 involved in 2,3-epoxidation and 3,4-epoxidation. *Mol Pharmacol*, 20: 234-235.

Lauriault VV, Khan S, O'Brien PJ. 1992. Hepatocyte cytotoxicity induced by various hepatotoxins mediated by cytochrome P-450IIE1 – protection with diethyldithiocarbamate administration. *Chem-Biol Interact*, 81: 271-289.

Legraverend C, Mode A, Westin S, Ström A, Eguchi H, Zaphiropoulos PG, Gustafsson JA. 1992a. Transcriptional regulation of P-450 2C gene subfamily members by the sexually dimorphic pattern of growth hormone secretion. *Mol Endocrinol*, 6: 259-266.

Legraverend C, Mode A, Wells T, Robinson I, Gustafsson JA. 1992b. Hepatic steroid hydroxylating enzymes are controlled by the sexually dimorphic pattern of growth hormone secretion in normal and dwarf rats. *FASEB J*, 6: 711-718.

Lewis DFV, Hrsg. 1996. *Cytochrome P450: Structure, function and mechanism*. Washington, Bristol: Taylor & Francis.

Lewis DFV, Hrsg. 2000. *Cytochromes P450 – structure, function and mechanism*. Washington, Bristol: Taylor & Francis.

Lind RC, Gandolfi AJ. 1999. Hepatoprotection by dimethyl sulfoxide. I. Protection when given twenty-four hours after chloroform or bromobenzene. *Toxicologic Pathol*, 27: 342-347.

Lindros KO, Yuan C, Penttilä KE. 1990. Role of ethanol-inducible cytochrome-P-450 IIE1 in carbon-tetrachloride induced damage to centrilobular hepatocytes from ethanol-treated rats. *Hepatology*, 12: 1092-1097.

Linß W, Fanghänel J, Hrsg. 1999. *Histologie. Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie*. Berlin, New York: Verlag Walter de Gruyter.

Löffler G, Petrides PE, Hrsg. 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer-Verlag, 1103-1120.

Lucas N. 2003. Transplantation einer syngen fetalen Lebergewebesuspension in die Milz: Untersuchung der transplantierten Leberzellen im Vergleich zur Normalleber hinsichtlich ihrer Morphologie, der Expression verschiedener Cytochrom P450-Subtypen und des Gehaltes an Glykogen und Albumin zu verschiedenen Zeiten nach Transplantation und nach Gabe von Induktoren, Mitogenen und Zellgiften [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.

Lupp A, Lucas N, Danz M, Klinger W. 2000. Transplantation of fetal liver tissue suspensions into the spleen of adult syngenic rats: effect of different cytotoxins on cytochrome P450 isoforms expression and on glycogen content. *Exp Toxic Pathol*, 52: 381-393.

Lupp A, Hugenschmidt S, Rost M, Müller D. 2004. Influence of recipient gender on intrasplenic fetal liver tissue transplants in rats: cytochrome P450-mediated monooxygenase functions. *Toxicology*, 197: 199-212.

Maganto P, Cienfuegos JA, Santamaria L, Rodriguez V, Eroles G, Andres S, Castillo-Olivares JL, Municio AM. 1990a. Auxiliary liver by transplanted frozen-thawed hepatocytes. *J Surg Res*, 48: 24-32.

Maganto P, Traber PG, Rusnell C, Dobbins WO, Keren D, Gumucio JJ. 1990b. Long-term maintenance of the adult pattern of liver-specific expression for P-450b, P-450e, albumin and α -fetoprotein genes in intrasplenically transplanted hepatocytes. *Hepatology*, 11: 585-592.

Maines MD, Kappas A. 1976. Studies on the mechanism of induction of haem oxygenase by cobalt and other metal ions. *Biochem J*, 154: 125-131.

Maines MD, Kappas A. 1977. Metals as regulators of heme metabolism. *Science*, 198: 1215-1221.

Maines MD. 1981. Enzymatic basis of metal ion alterations of cellular heme and glutathione metabolism. *Fundam Appl Toxicol*, 1: 358-367.

Makowka L, Rotstein LE, Falk JA, Lange B, Nossal NA, Blendis LM, Phillips NJ. 1980. Reversal of toxic and anoxic induced hepatic failure by syngenic, allogenic and xenogenic hepatocyte transplantation. *Surgery*, 88: 244-253.

Manno M, Ferrara R, Cazzaro S, Rigotti P, Ancona E. 1992. Suicidal inactivation of human cytochrome-P-450 by carbon-tetrachloride and halothane in vitro. *Pharmacol Toxicol*, 70: 13-18.

Markus B, Auth MKH, Encke A. 1995. Hepatozyten: Zukunftshoffnung oder baldige Alternative zur Lebertransplantation? *Deutsches Ärzteblatt*, 92: 95-99.

Marquardt H, Schäfer SG, Hrsg. 2003. *Lehrbuch der Toxikologie*. 2. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 69-71.

Mason HS, Fowlks WL, Peterson E. 1955. Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J Am Chem Soc*, 77: 2914-2915.

Matas AJ, Sutherland DER, Steffes MW, Simmons RL, Najarian JS. 1975. Hepatocellular transplantation in UDP-glucuronyltransferase deficient rats. *Surg Forum*, 26: 428-431.

Matas AJ, Sutherland DER, Steffes MW, Mauer SM, Lowe A, Simmons RL, Najarian JS. 1976. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science*, 192: 892-894.

Matsubara T, Koike M, Touchi A, Tochino Y, Sugeno K. 1976. Quantitative determination of cytochrome P450 in rat liver homogenate. *Anal Biochem*, 75: 596-603.

Matsusaka S, Toyosaka A, Nakasho K, Tujimura T, Sugihara A, Takanashi T, Uematsu K, Terada N, Okamoto E. 2000. The role of oval cells in rat hepatocyte transplantation. *Transplantation*, 70: 441-446.

- Mehigan DG, Bell WR, Zuidema GD, Eggleston JC, Cameron IL. 1980. Disseminated intravascular coagulation and portal hypertension following pancreatic islet autotransplantation. *Ann Surg*, 191: 287-292.
- Minato M, Houssin D, Demma I, Morin J, Gigou M, Szekely AM, Bismuth H. 1984. Transplantation of hepatocytes for treatment of surgically induced acute hepatic failure in the rat. *Eur Surg Res*, 16: 162-169.
- Mito M, Hidetaka E, Kusano M, Onishi T, Saito T, Sakamoto S. 1979. Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation*, 28: 499-505.
- Mito M, Kusano M. 1993. Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transplant*, 2: 65-74.
- Miyanaka K, Gothoh T, Nagasaki A, Takeya M, Ozaki M, Iwase K, Takiguchi M, Iyama KI, Tomita K, Mori M. 1998. Immunohistochemical localization of arginase II and other enzymes of arginine metabolism in rat kidney and liver. *Histochem J*, 30: 741-751.
- Monks TJ, Lau SS, Gillette JR. 1983. A dual role für glutathione transferase in the detoxification of bromobenzene-3,4-oxide. *Fed Proc*, 42: 1137-1137.
- Murayama N, Shimada M, Yamazoe Y, Kato R. 1991. Difference in susceptibility of two phenobarbital-inducible forms, P450IIB1 and P450IIB2, to thyroid hormone- and growth hormone-induced suppression in rat liver: phenobarbital-inducible P450IIB2 suppression by thyroid hormone acting directly, but not through the pituitary system. *Mol Pharmacol*, 39: 811-817.
- Muriel P. 1997. Peroxidation of lipids and liver damage. In: Baskin SI, Salem H, Hrsg. *Oxidants, antioxidants and free radicals*. London, Bristol: Taylor & Francis, 237-257.
- Nagata H, Ito M, Cai J, Edge AS, Platt JL, Fox IJ. 2003. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterol*, 124: 422-431.
- Nakajima T. 1997. Cytochrome P450 isoforms and the metabolism of volatile hydrocarbons of low relative molecular mass. *J Occup Health*, 39: 83-91.
- Nakamura J, Okamoto T, Schumacher IK, Tabei I, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Fox IJ. 1997. Treatment of surgically induced acute liver failure by transplantation of conditionally immortalized hepatocytes. *Transplantation*, 63: 1541-1547.

Nash T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J*, 55: 416-421.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42.

Oinonen T, Lindros KO. 1998. Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem J*, 329: 17-35.

Oraumbo IF, Van Duuren BL. 1987. Time-related binding of the hepatocarcinogen carbon tetrachloride to hepatic chromatin proteins in vitro. *Carcinogenesis*, 8: 855-856.

Oraumbo IF, Van Duuren BL. 1989. Evidence for the covalent interaction of carbon tetrachloride with mouse liver chromatin in vitro. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 9: 13-18.

Oren R, Dabeva MD, Petkov PM, Hurston E, Laconi E, Shafritz DA. 1999. Restoration of serum albumin levels in Nagase analbuminemic rats by hepatocyte transplantation. *Hepatology*, 29: 75-81.

Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. 1996. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nature Genetics*, 12: 266-273.

Pack GT, Islami AH, Hubbard JC, Brasfield RD. 1962. Regeneration of human liver after major hepatectomy. *Surgery*, 52 : 617-623.

Pampori NA, Agrawal AK, Shapiro BH. 2001. Infusion of gender-dependent plasma growth hormone profiles into intact rats: effects of subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous routes of rat and human growth hormone on endogenous circulating growth hormone profiles and expression of sexually dimorphic hepatic cyp isoforms. *Drug Metab Dispos*, 29: 8-16.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ. 2003. The expression of CYP2B6, CYP 2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochem Biophys Acta*, 1619: 243-253.

Plaa GL. 1997. Free-radical-mediated liver injury. In: Wallace KB, Hrsg. Free radical toxicology. London, Bristol: Taylor & Francis, 47-70.

Pohl RJ, Fouts JR. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem*, 107: 150- 155.

Pompella A, Maellaro E, Casini AF, Comporti M. 1987. Histochemical detection of lipid-peroxidation in the liver of bromobenzene-poisoned mice. *Amer J Pathol*, 129: 295-301.

Pronko PS, Jarvelainen HA, Lindros KO. 2002. Acinar distribution of rat liver arylamine N-acetyltransferase: effect of chronic ethanol and endotoxin exposure. *Pharmacol Toxicol*, 90: 150-154.

Quondamatteo F, Schulz TG, Bunzel N, Hallier E, Herken R. 1998. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferase-T1 in murine kidney, liver, and lung. *Histochem Cell Biol*, 110: 417-423.

Racine L, Scoazec JY, Verthier N, Bernuau D, Feldmann G. 1994. Morphological aspects of hepatocytes transplanted into the spleen. *Transplantation*, 5: 129-135.

Racine-Samson L, Scoazec JY, Moreau A, Christa L, Bernuau D, Feldmann G. 1996. Coexpression of periportal and perivenous enzymes in rat hepatocytes after experimental bile duct ligation: comparison with intrasplenically transplanted hepatocytes. *Histochem Cell Biol*, 105: 319-329.

Ram PA, Waxman DJ. 1991. Hepatic P450 expression in hypothyroid rats: differential responsiveness of male-specific P450 forms 2a (IIIA2), 2c (IIC11), and RLM2 (IIA2) to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*, 5: 13-20.

Raucy JL, Kraner JC, Lasker LM. 1993. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome-P4502E1. *Crit Rev Toxicol*, 23: 1-20.

Recknagel RO, Glende EA Jr. 1973. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol*, 2: 263-297.

Ribeiro J, Nordlinger B, Ballet F, Cynober L, Coudray-Lucas C, Baudrimont M, Legendre C, Delelo R, Panis Y. 1992. Intrasplenic hepatocellular transplantation corrects hepatic encephalopathy in portocaval-shunted rats. *Hepatology*, 15: 12-18.

Rombach EM, Hanzlik RP. 1999. Detection of adducts of bromobenzene 3,4-oxide with rat liver microsomal protein sulfhydryl groups using specific antibodies. *Cem Res Toxicol*, 12: 159-163.

Rosenberg DW, Drummond GS, Smith TJ. 1995. Depletion of cytochrome P-450 by thyroid hormone and cobalt-protoporphyrin IX in rat liver: evidence that susceptibility varies among forms of the heme protein. *Pharmacology*, 51: 254-262.

Rozga J, Holzman M, Moscioni AD, Fujioka H, Morsiani E, Demetriou AA. 1995. Repeated intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic rats. *Cell Transplant*, 4: 237-243.

Rozga J. 2002. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure. *Med Sci Monit*, 8: 32-38.

Runge D, Fleig WE, Michalopoulos GK, Strom SC, Runge DM. 2000. Hepatozytentransplantation: Einsatzmöglichkeiten und Beispiele der praktischen klinischen Anwendung. *Dtsch med Wschr*, 125: 397-400.

Rushmore TH, Kong AN. 2002. Pharmacogenomics, regulation and signalling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*, 3: 481-490.

Sakai H, Tsukamoto T, Yamamoto M, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Masegi T, Tatematsu M. 2001. Differential effects of partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration on induction of liver cell foci in a model for detection of initiation activity. *Jpn J Cancer Res*, 92: 1018-1025.

Sandbichler P, Erhart R, Herbst P, Vogel W, Herold M, Dietze O, Schmid T, Klima G, Margreiter R. 1994. Hepatocellular transplantation into the lung in chronic liver failure following bile duct obstruction in the rat. *Cell Transplant*, 3: 409-412.

Sasame HA, Boyd MR. 1978. Paradoxical effects of cobaltous chloride and salts of other divalent metals on tissue levels of reduced glutathione and microsomal mixed-function oxidase components. *J Pharmacol Exp Ther*, 205: 718-724.

Sawa M, Kasai S, Mito M. 1986. Cryopreservation of fetal rat liver tissue – a morphological investigation. *Jpn J Surg*, 16: 447-455.

Schumacher IK, Okamoto T, Kim BH, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Fox IJ. 1996. Transplantation of conditionally immortalized hepatocytes to treat hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 24: 337-343.

Segall M. 2004. P450cam with bound camphor. <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/mds21/thesis/node50.html#1613>.

- Seglen PO. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth Cell Biol*, 13: 30-83.
- Selden C, Gupta S, Johnstone R, Hodgson H. 1984. The pulmonary vascular bed as a site for implantation of isolated liver cells in inbred rats. *Transplantation*, 38: 81-83.
- Sesardic D, Rich KJ, Edwards RJ, Davies DS, Boobis AR. 1989. Selective destruction of cytochrome P-450d and associated monooxygenase activity by carbon tetrachloride in the rat. *Xenobiotics*, 19: 795-811.
- Sevanian A, McLeod L. 1997. Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: Wallace KB, Hrsg. *Free radical toxicology*. London, Bristol: Taylor & Francis, 47-70.
- Shapiro BH, Agrawal AK, Pampori NA. 1995. Gender differences in drug metabolism regulated by growth hormone. *Int J Cell Biol*, 27: 9-20.
- Sharp P, LaRegina M. 1998. *The laboratory rat*. London, Boca Raton: CRC Press.
- Shatford RA, Nyberg SL, Meier SJ, White JG, Payne WD, Hu WS, Cerra FB. 1993. Hepatocyte function in a hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver. *J Surg Res*, 53: 549-557.
- Shimada M, Murayama N, Nagata K, Hashimoto H, Ishikawa H, Yamazoe Y. 1997. A specific loss of growth hormone abolished sex-dependent expression of hepatic cytochrome P450 in dwarf rats: reversal of the profiles by growth hormone treatment. *Arch Biochem Biophys*, 337: 34-42.
- Sierra E, Maganto P, Codesal J, Mula N, Cubero J, Arza E, Castillo-Olivares JL, Arahuetes RM. 2000. Liver gene expression and increase in albumin synthesis by fetal hepatocytes transplanted into analbuminemic rats. *Life Sci*, 67: 2417-2432.
- Silkworth JB, Lipinkas T, Stoner CR. 1995. Immunosuppressive potential of several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) found in a superfund site: new model used to evaluate additive interactions between benzo(a)pyrene and TCDD. *Toxicology*, 105: 375-386.
- Sommer BG, Sutherland DER, Simmons RL, Najarian JS. 1979a. Hepatocellular transplantation for experimental acute liver failure in dogs. *Surg Forum*, 30: 279-281.

- Sommer BG, Sutherland DER, Matas AJ, Simmons RL, Najarian JS. 1979b. Hepatocellular transplantation for treatment of D-galactosamine induced acute liver failure in rats. *Transplant Proc*, 11: 578-584.
- Song EW, Chen JS, Wang K, Zhang HW, Su FX, Wang MH, Heemann U. 2002 Intrasplenic transplantation of syngenic hepatocytes modified by IFN-gamma gene ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Transplant Int*, 15: 472-478.
- Soriano HE, Wood RP, Kang DC, Ozaki CF, Finegold MJ, Bischoff FC, Reid BS, Ferry GD. 1997. Hepatocellular transplantation (HCT) in children with fulminant liver failure (FLF). *Hepatology*, 26: 443.
- Soucek P, Gut I. 1992. Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica*, 22: 83-101.
- Spinelli SV, Rodriguez JV, Quintana AB, Mediavilla MG, Guibert EE. 2002. Engraftment and function of intrasplenically transplanted cold stored rat hepatocytes. *Cell Transplant*, 11: 161-168.
- Stefan AM, Coulter S, Gray B, LaMorte W, Nikelaeson S, Edge ASB, Afdhal NH. 1999. Xenogeneic transplantation of porcine hepatocytes into the CCl₄ cirrhotic rat model. *Cell Transplant*, 8: 649-659.
- Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP. 1997a. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*, 63: 559-569.
- Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, Barranger JA, Towbin RB, Charron M, Miele L, Pisarov LA, Dorko K, Thompson MT, Reyes J. 1997b. Transplantation of human hepatocytes. *Transpl Proc*, 29: 2103-2106.
- Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. 1999. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis*, 19: 39-48.
- Sutherland DER, Numata M, Matas AJ, Simmons RL, Najarian JS. 1977a. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery*, 82: 124-132.

- Sutherland DER, Matas AJ, Steffes MW, Simmons RL, Najarian JS. 1977b. Transplantation of liver cells in an animal model of congenital enzyme deficiency disease: the Gunn rat. *Transplant Proc*, 9: 317-319.
- Suzuki A, Taniguchi H, Zheng YW, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yazawa K, Otsuka M, Yoshiki A, Kusakabe M, Fukao K, Nakauchi H. 2000. Proliferative and functional ability of transplanted murine neonatal hepatocytes in adult livers. *Transplant Proc*, 32: 2370-2371.
- Takahashi S, Takahashi T, Mizobuchi S, Matsumi M, Morita K, Miyazaki M, Namba M, Akagi R, Hirakawa M. 2002. Increased cytotoxicity of carbon tetrachloride in a human hepatoma cell line overexpressing cytochrome P450 2E1. *J Intern Med Res*, 30: 400-405.
- Then P, Sandbichler P, Erhart R, Dietze O, Klima G, Vogel W, Margreiter R. 1991. Hepatocyte transplantation into the lung for treatment of acute hepatic failure in the rat. *Transplant Proc*, 23: 892-893.
- Tortora GJ, Grabowski SR, Hrsg. 1996. *Principles of Anatomy and Physiology*. Pymble, Glenfield, New York, Ontario, London, New Delhi: HarperCollins Publishers Ltd.
- Umehara Y, Hakamada K, Seino K, Aoki K, Toyoki Y, Sasaki M. 2001. Improved survival and ammonia metabolism by intraperitoneal transplantation of microencapsulated hepatocytes in totally hepatectomized rats. *Surgery*, 130: 513-520.
- Vogels BAPM, Maas MAW, Bosma A, Chamuleau RAFM. 1996. Significant improvement of survival by intrasplenic hepatocyte transplantation in totally hepatectomized rats. *Cell Transplant*, 5: 369-378.
- Vons C. 2001. Transplantation of isolated hepatocytes: an alternative to whole-liver transplantation: treatment of hereditary metabolic liver disease. *J Chir*, 138: 342-346.
- Vroemen JPAM, Buurman WA, Heirwegh KPM, van der Linden CJ, Kootstra G. 1986. Hepatocyte transplantation for enzyme deficiency disease in congenic rats. *Transplantation*, 42: 130-135.
- Vroemen JPAM, Buurman WA, van der Linden CJ, Visser R, Heirwegh KPM, Kootstra G. 1988. Transplantation of isolated hepatocytes into the pancreas. *Eur J Surg*, 220: 1-11.
- Waldeyer A, Hrsg. 2002. *Anatomie des Menschen*. Berlin, New York: Verlag Walter de Gruyter.

Walsh TJ, Eggleston JC, Cameron IL. 1982. Portal hypertension, hepatic infarction and liver failure complicating pancreatic islet transplantation. *Surgery*, 91: 485-487.

Wang PY, Kaneko T, Tsukada H, Nakano M, Nakajima M, Sato A. 1997. Time courses of hepatic injuries induced by chloroform and by carbon tetrachloride: comparison of biochemical and histopathological changes. *Arch Toxicol*, 71: 638-645.

Wang RS, Nakajima T, Honma T. 1999. Different change patterns of cytochrome P450 and glutathione S-transferases in chemically induced liver damage in rat. *Industrial Health*, 37: 440-448.

Wang H, LeCluyse EL. 2003. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clin Pharmacokinet*, 42: 1331-1357.

Waxman DJ. 1992. Regulation of liver specific steroid metabolizing cytochromes P-450: cholesterol 7 α -hydroxylase, bile acid 6 β -hydroxylase, and growth-hormone-responsive steroid hormone hydroxylases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43: 1055-1072.

Waxman DJ, Ram PA, Pampori NA, Shapiro BH. 1995. Growth hormone regulation of male-specific rat liver P-450s 2A2 and 3A2: induction by intermittent growth hormone pulses in male but not in female rats rendered growth hormone deficient by neonatal monosodium glutamate. *Mol Pharmacol*, 48: 790-797.

Weber LW, Boll M, Stampfl A. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33: 105-136.

Westin S, Ström A, Gustafsson JA, Zaphiropoulos PG. 1990. Growth hormone regulation of the cytochrome P-450 IIC subfamily in the rat: inductive, repressive and transcriptional effects on P-450f (IIC7) and P450PB1 (IIC6) gene expression. *Mol Pharmacol*, 38: 192-197.

Wiederkehr JC, Kondos GT, Pollak R. 1990. Hepatocyte transplantation for the low-density lipoprotein receptor-deficient state. *Transplantation*, 50: 466-476.

Willson TM, Kliewer SA. 2002. PXR, CAR and drug metabolism. *Nature Reviews*, 1: 259-266.

Wilson JM, Chowdhury NR, Grossmann M, Wajsman R, Waxman R, Epstein A, Mulligan RC, Chowdhury JR. 1990. Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 8437-8441.

Wong FWJ, Chan WY, Lee SST. 1998. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP 2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*, 153: 109-118.

Woods RJ, Fuller BJ, Attenburrow VD, Nutt LH, Hobbs KEF. 1982. Functional assessment of hepatocytes after transplantation into rat spleen. *Transplantation*, 33: 123-126.

Wu J, Karlsson K, Danielsson A. 1997. Effects of vitamins E, C and catalase on bromobenzene- and hydrogen peroxide-induced intracellular oxidation and single-strand breakage in Hep G2 cells. *J Hepatol*, 26: 669-677.

Xiangdong W, Ar'Rajab A, Ahren B, Andersson R, Bengmark S. 1991. Improvement of the effects of intrasplenic transplantation of hepatocytes after 90% hepatectomy in the rat by cotransplantation with pancreatic islets. *Transplantation*, 52: 462-466.

Zangar RC, Benson JM, Burnett VL, Springer DL. 2000. Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. *Chem-Biol Interact*, 125: 233-243.

Zhang H, Miescher-Clemens E, Drugas G, Lee SM, Colombani P. 1992. Intrahepatic hepatocyte transplantation following subtotal hepatectomy in the recipient: a possible model in the treatment of hepatic enzyme deficiency. *J Pediatr Surg*, 27: 312-315.

Zhou XH, Maronpot RR, Hedlund LW, Cofer GP, Johnson GA. 1995. Detection of bromobenzene-induced hepatocellular necrosis using magnetic-resonance microscopy. *Magn Res Med*, 3: 853-857.

9. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. med. A. Lupp.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Udo Fuchs

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. A. Lupp recht herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung, die sie mir jederzeit zuteil werden ließ, danken.

11. LEBENSLAUF

Name: Udo Alexander Fuchs

Geburtsdatum: 18. Mai 1973

Geburtsort: Jena

Familienstand: ledig

Sept. 1979 - Dez. 1984	Polytechnische Oberschule (POS) "DSF", Rudolstadt
Jan. 1985 - Juli 1989	POS "Werner-Seelenbinder" Buttstädt
Aug. 1989 - Juni 1991	Erweiterte Oberschule "Ernst-Schnellert" Sömmerda
Juni 1991	Abitur (Note: 1,8)
Sept. 1991 - April 1992	Gemeinnützige Arbeit im Kloster Sankt Wiberti
Mai 1992 - Aug. 1993	Zivildienst
Okt. 1993 - Nov. 2000	Medizinstudium an der Friedrich Schiller Universität Jena
Sept. 1995	Ärztliche Vorprüfung (Note: 1,6)
Aug. 1996	1. Ärztliche Prüfung (Note: 2,0)
März 1999	2. Ärztliche Prüfung (Note: 2,0)
Nov. 1999	3. Ärztliche Prüfung (Note: 2,3)
Jan. 2000 - Nov. 2000	Arzt im Praktikum an der Helios-Klinik Gotha, Chirurgie
Dez. 2000 - Juli 2001	A.i.P. im Robert-Koch-Klinikum Apolda, Chirurgie
Aug. 2001 - Dez. 2003	Assistenzarzt im RKK Apolda, Innere Medizin
Jan. 2004 - Juni 2004	Assistenzarzt im RKK Apolda, Pädiatrie
seit Juli 2004	Assistenzarzt in der Allgemeinmedizinischen Praxis Dipl. med. Gerlinde Fuchs in Buttstädt

Jena, den

Udo Fuchs